



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ELEKTROCHEMICKÁ ANALÝZA RNA: VÝVOJ METÓDY VHODNEJ PRE CHARAKTERIZÁCIU PRODUKTOV NEENZYMATICKEJ POLYMERÁCIE CYKLICKÝCH NUKLEOSID MONOFOSFÁTOV ZA PODMIENOK MODELÚJÚCICH PREBIOTICKÉ PROSTREDIE

ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF RNA: DEVELOPMENT OF A METHOD SUITABLE FOR THE
CHARACTERIZATION OF PRODUCTS OF NON-ENZYMATIC POLYMERIZATION OF CYCLIC
NUCLEOSIDE MONOPHOSPHATES UNDER CONDITIONS MODELING PREBIOTIC ENVIRONMENT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ONDREJ HESKO

VEDÚCI PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. JAN ŠPAČEK, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1269/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Ondřej Hesko**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Špaček, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Elektrochemická analýza RNA: Vývoj metody vhodnej pre charakterizáciu produktov neenzymatickej polymerácie cyklických nukleosid monofosfátov za podmienok modelujúcich prebiotické prostredie

Zadání diplomové práce:

Elektrochemické metody jsou využívány ke studiu a analýze nukleových kyselin (NK) po několik desetiletí. Přitom se využívá jednak vlastní elektrochemické aktivity jejich složek (nukleobází, které poskytují specifické elektrochemické signály díky jejich oxidaci nebo redukci), jednak různých způsobů značení pomocí externích redox aktivních skupin. Právě v oblasti „label-free“ analýzy NK pomocí uhlíkových elektrod došlo v poslední době k významnému pokroku, pokud jde o její využitelnost pro jednoduchou charakterizaci fragmentů DNA nebo RNA z hlediska jejich sekvence, struktury, délky molekul a chemické modifikace. Nedávné výsledky z laboratoře školitele ukazují, že jednou z oblastí aplikace zdokonalených elektrochemických metod je i studium neenzymatické polymerace cyklických nukleosid monofosfátů, která je součástí tzv. formamidové teorie vzniku života. V rámci diplomové práce bude optimalizována metoda charakterizace produktů této reakce v podmínkách modelujících probiotické prostředí.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Abstrakt

Táto diplomová práca sa zaoberá optimalizáciou elektrochemickej metódy na charakterizáciu produktov neenzymatickej polymerizácie 3',5' -cyklického guanosínmonofosfátu (cGMP) v podmienkach modelujúcich prebiotické prostredie. Experimenty boli prevádzané adsorpčnou prenosovou technikou na uhlíkovej elektróde a gélovou elektroforézou. Optimalizácia metódy bola prevedená na modelovom systéme vzoriek oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku cGMP na uhlíkovej elektróde, na ktorej povrch sa adsorbuje DNA a RNA. Technika umožňuje jednoduché odstránenie interferujúcich látok ako cGMP, ktorý sa vyskytuje v pôvodnom vzorku, ale neadsorbujú sa na povrch elektródy alebo sa na neho adsorbujú podstatne slabšie ako oligonukleotidy a polynukleotidy. Analýza je založená na selektívnom odstránení cGMP z povrchu elektródy chemickými a fyzikálnymi metódami pred prevedením samotného merania technikou lineárnej voltametrie. Pre selektívnu desorpciu cGMP boli použité detergenty ako SDS, Tween 20 a Triton x-100 o rôznej koncentrácii a bolo použité elektrostatické odpudzovanie cGMP vložení rôznych záporných potenciálov na uhlíkovú elektródu. Pri použití všetkých detergentov a vložených záporných potenciálov dochádzalo ku selektívnej desorpcii cGMP. Použité metódy boli porovnané, kedy najúčinnější bola vyhodnotená desorpcia cGMP z povrchu elektródy pomocou SDS. Desorpcia oligonukleotidov bola minimalizovaná použitím vloženého kladného potenciálu na premývanú uhlíkovú elektródu v 0,01% SDS v bázičkom prostredí. Optimalizovaná metóda bola použitá na elektrochemickú analýzu preliminárnych vzoriek neenzymatickej polymerizácie 3',5' -cGMP a porovnaná s gélovou elektroforézou.

Summary

This thesis focuses on the optimization of the electrochemical method, which characterizes products of untemplated nonenzymatic polymerization of 3',5' -cyclic guanosine monophosphate (cGMP) under conditions modeling prebiotic environment. An adsorptive transfer stripping techniques on carbon electrode and gel electrophoresis were used. The method was optimized on the model system of oligonucleotides located in solution of cGMP on carbon electrode, where DNA and RNA adsorb. This technique allows simple removing of interfering substances such as cGMP, which are not present in the original sample, but they do not adsorb on the surface of electrode or they adsorb weaker than oligonucleotides or polynucleotides. Analyses are based on the selective desorption of cGMP from the surface of the carbon electrode by the chemical and physical methods before the measurement of linear voltammetry itself. Detergents, such as SDS, Tween 20 and Triton x-100 with different concentrations and electrostatic repulsions of cGMP with different negative potentials on the carbon electrode were used for the selective desorption of cGMP. The selective desorption of cGMP was observed for all detergents and inserted negative potentials. Used methods were compared and the most effective detergent for selective desorption of cGMP was SDS. Desorption of oligonucleotides was minimized by inserted positive potential on washed carbon electrode in 0,01% SDS in basic medium. This optimized method was used on electrochemical analysis of preliminary samples of untemplated nonenzymatic polymerization of 3',5' -cGMP and compared to the analysis of gel electrophoresis.

Kľúčové slová

Elektrochemická analýza, lineárna voltametria, adsorpčná prenosová voltametria, detergent, neenzymatická polymerizácia cGMP, RNA svet

Keywords

Electrochemical analyses, linear voltammetry, adsorptive transfer stripping voltammetry, detergent, nonenzymatic polymerization of cGMP, RNA world

HESKO, O. *Elektrochemická analýza RNA: Vývoj metódy vhodnej pre charakterizáciu produktov neenzymatickej polymerácie cyklických nukleosid monofosfátov za podmienok modelujúcich prebiotické prostredie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 57 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Jan Špaček, Ph.D. .

PREHLÁSENIE:

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval.

Bc. Ondrej Hesko

POĎAKOVANIE:

Týmto by som chcel poďakovať vedúcemu diplomovej práce Mgr. Jan Špačekovi, Ph.D. za odborné vedenie a pomoc pri analýze dát. Ďalšie obrovské ďakujem patrí doc. RNDr. Miroslav Fojtovi, CSc., Judit E.Šponerovej, Ph.D. a Ing. Filip Mravcovi, Ph.D. za vedenie a konzultácie. Rovnako by som chcel poďakovať rodine za podporu pri štúdiu.

Obsah

1	Úvod	1
2	Teoretická časť	2
2.1	Abiogenézia	2
2.2	RNA svet	2
2.3	Chemické prekurzory	4
2.3.1	Dechtový paradox	4
2.4	Chémia formamidu	5
2.4.1	Vznik formamidu	5
2.4.2	Stabilita formamidu	5
2.4.3	Reaktivita formamidu	5
2.4.4	Organokatalýza vo formamidovej chémii - stabilita nukleových bází	6
2.5	Syntéza nukleových bází	7
2.5.1	Syntéza purinových bází	7
2.5.2	Syntéza pyrimidinových bází	8
2.6	Formózova reakcia - tvorba nukleosidov	9
2.7	Fosforylácia a transfosforylácia – vznik nukleotidov	10
2.8	Polymerizácia za neenzymatických podmienok	10
2.9	Elektroanalytická chémia	14
2.9.1	Elektrochémia DNA	16
3	Experimentálna časť	20
3.1	Materiály	20
3.1.1	Chemikálie	20
3.1.2	Pufre a elektrolyty	20
3.1.3	Vzorky RNA	21
3.1.4	Enzymy a príslušné pufre	21
3.1.5	Elektródy	21
3.1.6	Prístroje	21
3.1.7	Software	21
3.2	Metódy	22
3.2.1	Gelová elektroforéza	22
3.2.2	Radioaktívne značenie oligonukleotidov izotopom ^{32}P	22
3.2.3	Adsorptívna prenosová technika	22
3.2.4	Elektrochemické meranie	22
4	Výsledky a diskusia	24
4.1	Elektrochemická analýza produktov neenzymatickej polymerizácie 3',5' cGMP	24
4.2	Selektívna desorpcia cGMP pomocou detergentov	25
4.2.1	Premývanie v Tritone x-100	25
4.2.2	Premývanie v SDS	28
4.2.3	Premývanie v Tweene 20	31
4.3	Odstraňovanie cGMP záporným potenciálom	36
4.3.1	Selektívne odstraňovanie cGMP pomocou záporného potenciálu	36

4.3.2	Selektívna desorpcia cGMP pomocou SDS v bazickom prostredí na kladne nabitom povrchu	41
4.4	Analýza produktov spontánnej neenzymatickej polymerizácie 3',5' -cGMP	42
4.4.1	Príprava vzoriek	42
4.4.2	Analýza oligonukleotidov pomocou gélovej elektroforézy	42
4.4.3	Analýza oligonukleotidov pomocou elektrochemickej metódy	44
5	Záver	46

1. Úvod

Elektrochemické metódy sa využívajú v širokom spektre vedeckých oblastí. Na prelome 50. a 60. rokov sa začali študovať prvýkrát elektrochemické vlastnosti DNA. Objavy spojené hlavne s technikou sekvenácie DNA, spôsobili a umožnili rozvoj elektrochemickej analýzy DNA. Napríklad na konci 60. rokov sa objavili sekvenčne špecifické reštrikčné endonukleázy, umožňujúce špecificky štiepiť a analyzovať DNA. O dekádu neskôr bola vyskúmaná technológia sekvenovania DNA, založená na časovo náročnej metóde gélovej elektroforézy. O trochu neskôr na analýzu DNA sa využívala hybridizácia pomocou blotovacej membrány. Popri vývoji týchto techník sa vyvíjali aj iné techniky vhodné pre rýchlu analýzu DNA. Jednou z nich bola polarografia. DNA poskytuje polarografické signály, ale okrem toho polarografické merania môžu poskytovať informácie o štruktúre DNA, ako aj stanoviť jednotlivé komponenty nukleových kyselín a produktov ich degradácie. Tieto skúmania sa stali základom pre neskoršie elektrochemické analýzy DNA, štúdiá o jej štruktúre, interakciách a poškodení [1].

V poslednej dobe došlo k významnému pokroku v oblasti elektrochemických analýz na uhlíkovej elektróde. Využívajú sa pre jednoduchú charakterizáciu fragmentov DNA alebo RNA z hľadiska ich sekvencie, štruktúry, dĺžky molekúl a chemickej modifikácie. V elektrochemických analýzách nukleových kyselín sa s výhodou využíva aj takzvaná *ex situ* adsorpčná prenosová technika [1]. Pri tejto technike sa môže využiť rozdielná sila adsorpcie DNA a RNA podľa dĺžky sekvencie na povrch uhlíkovej elektródy a odstrániť zo vzorku interferujúce látky ako cGMP, ktoré sa neadsorbujú alebo adsorbujú slabšie ako oligonukleotidy a polynukleotidy. Metóda ponúka alternatívnu možnosť analýzy produktov RNA molekúl vzniknutých spontánnou polymerizáciou 3',5'-cyklických nukleosidmonofosfátov popri gélovej elektroforéze. Elektrochémia nukleových kyselín je nádejnou metódou pre charakterizáciu DNA alebo RNA a môže dopĺňať časovo náročnejšiu metódu gélovej elektroforézy.

Cieľom tejto práce je optimalizácia alternatívnej elektrochemickej metódy na analýzu neenzymatickej polymerizácie 3',5'-cyklických nukleosidmonofosfátov za podmienok modelujúcich prebiotické prostredie [2], ktorá je súčasťou takzvanej formamidovej teórie vzniku života [3]. Metóda bola najprv optimalizovaná na modelovom systéme a neskôr bola prevedená elektrochemická analýza vzoriek produktov neenzymatickej polymerizácie. Následne boli porovnané elektrochemické a elektroforetické analýzy produktov neenzymatickej polymerizácie 3',5'-cyklických nukleosidmonofosfátov. Práca sa taktiež zaoberá problematikou teórie „RNA sveta“ a laboratórnymi modelmi vzniku života na Zemi.

2. Teoretická časť

2.1. Abiogenézia

Otázkou pôvodu a obdobiem vzniku života (abiogenézia) sa človek zaoberá od praveku. Prvé dochované mýty vzťahujúce sa ku vzniku života sú zaznamenané v písomnostiach z doby bronzovej a pravdepodobne vznik písma predchádzajú. Abiogenézia je udalosť, počas ktorej sa z neživej hmoty stala hmota živá, ktorá bola schopná sa vyvíjať, rozmnožovať a meniť svoje okolie. Počas rôznych období civilizácie sa na túto otázku pozeralo skôr filozofickým pohľadom, ktorý bol dlho ovplyvňovaný náboženstvom. Najstaršie náboženské učenia Číny, Egypta a Babylonu pripisovali vznik života rôznym tradíciám a legendám spojeným s tvorcami – bohmi. V antickej civilizácii bola patrná dôležitosť každodennej skúsenosti s formuláciou koncepcií, keďže chýbali metódy pre presné študovanie prírodných javov. Aristotelova formulácia vzniku života mala zásadný význam až do začiatku 19. storočia. Vo svojich prácach položil základy teórie spontánneho vzniku života z neživej hmoty - teória samoplodenia. Podľa jeho učenia sa živé organizmy skladajú z hmoty, ktorá má pasívnu podstatu a obsahuje aktívnu formu - dušu. Duša poskytuje organizáciu, energiu a pohyb organizmu [4]. Postupné uvažovanie o vzniku života sa presunulo od náboženských legiend až k testovateľným hypotézam.

V polovici 19. storočia práca Louisa Pasteura vyvrátila teóriu samoplodenia. Preukázal nemožnosť samovoľného vzniku mikroorganizmov z rôznych organických roztokov. Tieto experimenty viedli k názoru, že život sa nemohol formovať a vznikol spolu s neživou hmotou. Predpokládalo sa, že vesmír spolu s životom sú večné nielen na Zemi. Vznik života na Zemi sa vysvetľoval pomocou teórie panspermie, prenosom živej hmoty cez vesmír na medzihviezdnych telesách. Na začiatku 20. storočia došlo k ďalšiemu obratu a bola A. I. Oparinom a J. B. S. Haldanom vyvinutá teória prebiotckej polievky a postupného vzniku organických molekúl z jednoduchých anorganických látok, prítomných na mladej Zemi [4]. Teória bola podporená Miller-Ureyovým experimentom, simuláciou podmienok rannej Zeme, za predpokladu redukčného modelu atmosféry [5, 6]. Boli použité elektrické výboje generované dvojicou elektród na vytvorenie radikálov z pár vody, metánu (CH_4), amoniaku (NH_3) a vodíku (H_2). V zmesi sa syntetizovali produkty organických zlúčenín niektorých aminokyselín [6]. Z tejto reakčnej zmesi vznikal aj formaldehyd (CH_2O) a kyanovodík (HCN), ktorí boli kľúčovými intermediátmi pri vzniku glycínu [7]. Neskoršie výskumy ukázali, že redukčný model atmosféry je nepravdepodobný [8]. Tieto poznatky viedli J. Oro ku modifikovaniu postupu s využitím refluxu s vodným roztokom HCN . Produktom tejto polymerizácie bola nukleová báza adenín [9]. Buttlerov zistil, že dochádza ku polymerizácii formaldehydu v prítomnosti jednoduchých minerálov ako katalyzátoru za vzniku zmesi cukrov. Tento proces sa nazýva formózova reakcia [10]. Objavy, ktoré urobili Ori, Butlerov a Miller, ovplyvnili následné smerovanie výskumu prebiotckej chémie [11].

2.2. RNA svet

Definícia života z rôznych filozofických a historických aspektov sa nevyhnutne potýka obmedzeniami, týkajúcich sa rozličných pohľadov a prístupov. V akademickej sfére neexistuje zhoda na jednej definícii života, napriek tomu že do súčasnosti ich bolo v odborných časopisoch publikovaných viac ako 100. V definíciách sa najčastejšie vyskytujú slová sys-

tém, hmota, metabolizmus, komplexita, samoreprodukcia, evolúcia, prostredie a energia. Z môjho subjektívneho pohľadu život je dynamická súhra medzi genotypom a fenotypom. Je možné ho formulovať ako metabolizujúci materiál vzniklého z informačného systému so schopnosťou samoreprodukcie so zmenami (evolúciou) vyžadujúci energiu a vhodné prostredie. Z definície, že život je samoreprodukcia s variáciou [12] vyplýva, že život začína s prvou reprodukciou informačnej molekuly. Tento okamžik je taktiež počiatkom evolúcie, ktorá vysvetľuje vývoj života od jeho počiatku až do jeho súčasnej podoby.

V súčasnom svete každá individuálna entita, ktorá vykazuje vlastnosti života sa nazýva organizmus. Medzi základné znaky pre charakterizáciu prvej formy života patrí replikácia. Komplementarita nukleových bází (guanín - cytozín, adenín - tymín v DNA alebo tymín-uracil v RNA), umožňuje replikáciu súčasných organizmov [13]. Replikačný proces sekvencií nukleových bází má určitú chybovosť a nevyhnutne prináša variabilitu dcériných molekúl. DNA je informačná molekula, ktorá kóduje enzýmy zaisťujúce jej replikáciu. Tieto dva systémy, uloženie a kopírovanie informácie, môžu fungovať iba spoločne. Priamy vznik takto zložitého systému abiogéziou je vysoko nepravdepodobný. Tieto procesy museli mať pôvod v jednoduchšom systéme [3].

Existuje viacero hypotéz vzniku života na Zemi, najpravdepodobnejšia je teória RNA sveta - hypotetický evolučný krok vo vzniku života. RNA svet musel prechádzať vznik buniek, najstaršie dochované fosílné pozostatky bakteriálneho života pochádzajú z obdobia pred najmenej 3,77 miliardami rokov [14]. Samoreprodukujúca sa RNA molekula predchádzala formovaniu DNA a proteínom. Rovnako ako DNA, RNA môže uložiť a replikovať genetickú informáciu, vďaka komplementarite párov bází [15]. Pôsobenie selekčného tlaku na RNA zaisťuje variabilitu a možný vznik širokej škály molekúl s rôznymi funkciami [16]. Hypotézu RNA sveta podporuje aj možný vznik nukleových kyselín a jej prekurzorov v období rannej Zeme. Široká škála RNA molekúl a jej funkcií umožňuje aj tvorbu zložitejších systémov, formovanie dnešného života založeného na DNA a proteínoch. V kontraste nukleových kyselín, štruktúra proteínov nemá jednoduchý mechanizmus replikácie. Z toho vyplýva nutnosť najprv evolučného vývinu genetického systému pre ich syntézu [15]. Okrem funkcie uloženia genetickej informácie boli objavené aj molekuly RNA (ribozýmy), ktoré majú schopnosť podobne ako enzýmy, vystupovať v chemických reakciách ako katalyzátor [17]. Ribozýmy katalyzujú napríklad transfosforylačné reakcie – štiepenie a ligácia fosfodiesterových väzieb, čo umožňuje ich autokatalytickú replikáciu [18]. Ďalej katalyzujú tvorbu peptidovej väzby [19], čo sa pravdepodobne vyvinulo až do dnešného ribozómu – komplexu RNA a proteínov zaisťujúceho transláciu genetickej informácie. V neprospech hypotézy RNA sveta je nízka stabilita ribonukleovej kyseliny, neumožňujúca jej akumuláciu v období rannej Zeme. RNA sa napríklad degraduje pri vysokých teplotách [15], pri $\text{pH} > 6$ prebieha jej hydrolýza [20] a rozkladajú sa taktiež pri pôsobení ultrafialového žiarenia necloneného ozónom. Tieto faktory, môžu slúžiť ako selekčný tlak. Experimenty odhalili zatiaľ len zlomky možných reakcií. Stále sa nepodarilo vytvoriť alebo nájsť život založený len na ribonukleovej kyseline bez intervencie proteínov. RNA svet necháva veľa otázok stále nezodpovedaných, ale je aj tak v súčasnosti najlepším vysvetlením vzniku života [15].

2.3. Chemické prekurzory

Pre možný vznik prvej formy života založeného na polyméroch RNA, je potrebné vyriešiť najskôr pôvod monomerných jednotiek (nukleotid) a základných organických molekúl, z ktorých sa monoméry formovali (chemické prekurzory) v prebiotických podmienkach. V období formovania života bol Zemský povrch prevažne pokrytý vodou. Teplota sa pohybovala medzi 70–100 °C a pH bolo mierne kyslé (pH 5,8) [21]. Tvorbu Zemskej kôry ovplyvňovala intenzívna sopečná činnosť. Atmosféra sa skladala prevažne s CO₂ a N₂ a mala slabý redukčný charakter. Bola presýtená vodnou parou, popolom, prachom a v malom množstve obsahovala NH₃, CH₄, CO a H₂. Absencia voľného O₂ a O₃ umožňovala priechodu ultrafialového žiarenia. Obsah CO₂ vytváral silný skleníkový efekt a chránil Zem pred zmrznutím, čo viedlo k udržaniu stálych podmienok [8].

Formovanie života bolo ovplyvnené aj obdobím neskorého veľkého bombardovania na Zemi, kedy dopadajúce telesá mohli vytvárať špecifické vhodnejšie prostredie pre tvorbu samoreprodukujúcich RNA molekúl [22].

Vyhovujúci chemický prekurzor pre syntézu nukleových bází je formamid (HCONH₂) [23]. Jeho chemické vlastnosti umožňujú byť univerzálnym prekurzorom pre vznik nukleových bází. Zahriatie formamidu v prítomnosti rôznych katalyzátorov terestrálnych minerálov, podnecujú vznik všetkých nukleových bází [24].

Ďalší možný chemický prekurzor z ktorého vznikajú nukleové báze bez prítomnosti katalyzátoru je kyanovodík (HCN) [11]. Avšak aby mohol vzniknúť veľký súbor monomérov pre biogénne makromolekuly, HCN by musela prejsť zložitejším systémom reakčných dráh. Polymerizácia HCN za vzniku purínov prebieha pri nižších teplotách a formovanie pyrimidínov prebieha opačne za vysokých teplôt. Okrem neschopnosti tvorby všetkých nukleových bází za jednotných podmienok, HCN je navyše limitovaný veľkou reaktivitou a nízkymi výťažkami polymerizácie [11, 23]. Z dôvodu nižšej stability HCN sa navyše nevyskytoval na prebiotickú Zemi vo vysokých koncentráciách [25, 26]. Prebiotický scenár formovania RNA z HCN a HCONH₂ sú kompatibilné a mohli prebiehať na rannej Zemi zároveň.

2.3.1. Dechtový paradox

Formovanie života je založené na vzniku zložitejších organických molekúl, ktoré sú schopné replikácie a selekcie. Organické zlúčeniny pri dodaní voľnej energie vo forme tepla alebo svetla, ale nekontrolovateľne polymerizujú do dlhých molekúl a tvoria decht [27]. Chemické teórie ako druhý zákon termodynamiky, teória väzieb a teória štruktúr neumožňujú zastavenie polymerizácie, vznik a selekciu samoreplikujúcich molekúl [28]. Pre tvorbu živého systému, polymerizačné reakcie musia byť včas prerušené, aby nedochádzalo k vzniku neúžitčných molekúl dechtu. Z tohto dôvodu niektoré kroky syntézy museli prebehnúť za určitých podmienok, kedy reaktanty museli vstupovať do reakcie v špecifickom poradí a vo veľkom nadbytku [27]. Chemické prvky ako bór a oxidovaný molybdén, svojimi interakciami mohli uľahčovať vznik a zvyšovať stabilitu samoreplikujúcich molekúl [27, 29].

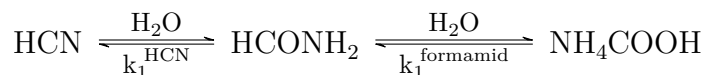
2.4. Chémia formamidu

2.4.1. Vznik formamidu

Formamid obsahuje v štruktúre všetky nevyhnutné prvky ako je H, C, O a N, ktoré sú okrem fosforu potrebné pre syntézu RNA [30]. Existuje niekoľko štúdií, ktoré interpretujú tvorbu formamidu v podmienkach vesmíru. Možných spôsobov vzniku formamidu je viacero, ako napríklad ožarovanie protónmi plyných zmesí metánu a dusíku [31], zo zmesí HCN, H₂O a NH₃ pod ultrafialovým žiarením [32], zo zmesí CO, NH₃ a H₂O počas pyrolýzy [33] a fotolýzy ľadov [34]. Podobne, sa formamid môže syntetizovať aj za terestriálnych podmienok z molekúl s nízkou molekulovou hmotnosťou, ako NH₃, kyselina mravčia a jej esterové deriváty, CO a alkoholy pri prítomnosti aj neprítomnosti katalyzátora. Z uvedených reakcií syntéza formamidu hydrolyzou HCN je v prebiotických podmienkach najpravdepodobnejšia [35]. V adsorbovanom stave HCN vo vode môžu prebehnúť dva procesy: polymerizácia s konečným produktom biomolekúl alebo derivátov poly(kyanovodíku), alebo hydrolyza adíciou vody na trojitú väzbu CN za vzniku formamidu. Tieto dva kompetitívne procesy majú podobnú kinetiku, ale pri nižších koncentráciách HCN, ktoré sú predpokladané v primitívnych oceánoch, dominuje hydrolyza [25].

2.4.2. Stabilita formamidu

Podľa nasledujúcej rovnice,



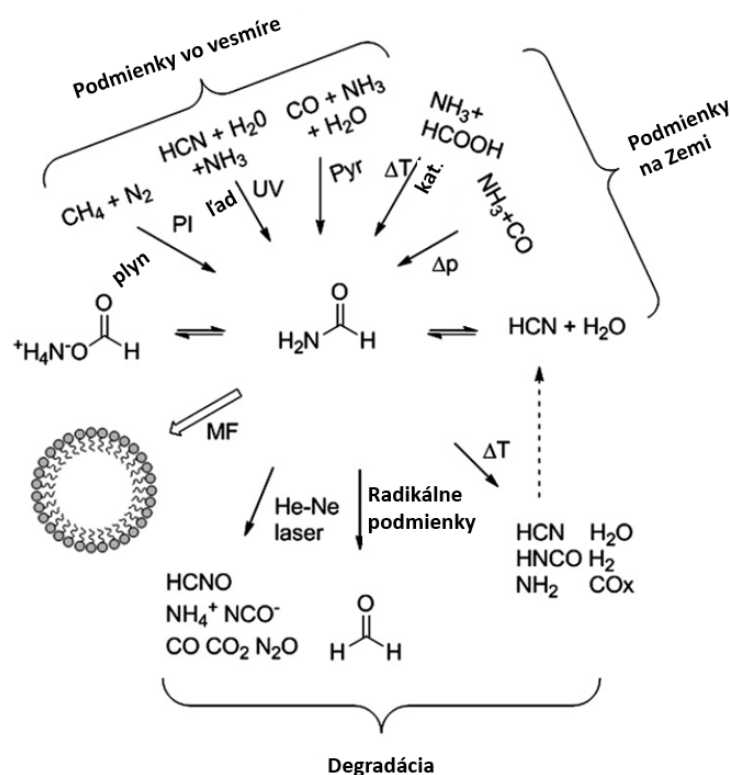
hydrolyzou formamidu vzniká mravčan amónny. Tento proces síce znižuje jeho koncentráciu, ale existujú alternatívne mechanizmy zakonzentrovania formamidu.

Pre formovanie bází je potrebná dostatočná koncentrácia formamidu. Jeho koncentrácia sa zvyšuje jednoduchým vyparením vody z jeho vodného roztoku [25, 36]. V prítomnosti minerálov, ako sú ílové montmorillonity, sa s vysokou efektivitou adsorbuje, čo zvyšuje jeho lokálnu koncentráciu [37]. Prostredníctvom elektrostatických interakcií a vodíkových mostíkov s kyslíkom alebo atómami kovu prítomných v kryštáli, sa formamid začleňuje do prázdneho priestoru medzi vrstvami minerálov [38], čo ovplyvňuje aj jeho reaktivitu [3]. Ďalšou možnosťou koncentrovania formamidu na horúcom povrchu Zeme je termálna disociácia mravčanu amónneho pri 180 °C, čo ukazuje aj chemická rovnica uvedená vyššie. Táto teplota je vyššia než bod varu vody a umožňuje tvorbu a akumuláciu bezvodného formamidového média [39]. Mravčan amónny je produktom reakcie NH₃ a kyseliny mravečej (produkt v Miller-Ureyovom experimente) [6, 39].

2.4.3. Reaktivita formamidu

Ďalší argument v prospech formamidu ako prebiotického prekurzoru je možnosť jeho čiastočnej degradácie, kde produkty môžu byť užitočné intermediáty v syntéze biomolekúl, čo zvyšuje sieť možných transformácií [40]. Jednou z možností je termický rozklad formamidu, na produkty NH₃ a CO, alebo HCN a vodu. Degradácia formamidu na HCN

prebieha v prítomnosti vhodných katalyzátorov ako sú oxidy kovov a zvýšenej teploty a uzatvára cyklickú transformáciu založenú na hydralyzačno-dehydratačnom systéme, kedy sa HCN môže opäť hydrolyzovať na formamid [41]. Selektivita transformácie formamidu závisí na fyzikálnych a chemických vlastnostiach povrchu minerálu použitého ako katalyzátora a na rozdielnych rýchlostných konštantách s možnými bočnými reakciami [42]. Ďalšie degradačné produkty sú deriváty poly(kyanovodíku), z ktorého sa môžu formovať nukleové báze v hydrolytických podmienkach, kedy formamid môže byť degradovaný na formaldehyd, zlúčeninu ktorá je dôležitým prekursorom cukrov [3]. Deriváty, ako N-methyl formamid a N, N-dimethyl formamid, ako aj samotný formamid môžu hrať dôležitú rolu v kompartmentalizácii prvej bunky, vytváraním micél [44]. Tieto micely mohli slúžiť ako prvé membrány, vytvárať vhodné prostredie pre priebeh reakcií vedúcich ku vzniku života a stabilizovať produkty.



Obrázek 2.1: Základná prebiotická chémia formamidu. PI: Ožiarenie fotónom. UV: Ožiarenie ultrafialovým žiarením. Pyr: Pyrolýza. ΔT a ΔP : Vysoká teplota a/alebo vysoký tlak. Kat: Reakcia prebiehajúca v prítomnosti katalyzátora. MF: Formácia micél [3].

Kondenzačné a parciálne degradačné produkty formamidu vrátane HCN, formaldehydu, kyseliny mravčej, oxidov uhlíka a NH_3 , sú v princípe intermediáty pre syntézu cukrov, peptidov a ďalších relevantných biomolekúl [45].

2.4.4. Organokatalýza vo formamidovej chémii - stabilita nukleových bází

Organokatalýza je katalytický proces, kde rýchlosť reakcie je zvýšená organickým katalyzátorom, ktorý je definovaný ako molekula obsahujúca vodík, uhlík a iné nekovové elementy [46]. V priebehu degradácie nukleových bází v reakčnej zmesi sa uvoľňuje forma-

mid, ktorý sa môže opäť zúčastniť na polymerizácii a resyntetizovať puríny a pyrimidíny. V princípe, formamid vystupuje ako začiatkový prekursor a organokatalyzátor v cykle syntézy a degradácie nukleových bází. Táto vlastnosť môže byť dôležitá v riešení a diskusii stability vzniklých nukleových bází v období rannej Zeme, kedy degradované produkty môže byť ľahko resyntetizované pod rovnakými experimentálnymi podmienkami [42]. Degradčné procesy môžu prebehnúť nukleofilnou adíciou formamidu na pozíciu C-8 purínu s otvorením imidazolového kruhu za vzniku zodpovedajúcich derivátov N-formamid pyrimidínu [47]. Môže prebiehať ďalšia degradácia za generovania formamidu a ďalších nízkomolekulárnych látok. Podobným mechanizmom, nukleofilnou adíciou na pozíciu C-4, C-6 pyrimidinového kruhu dochádza k tvorbe formamidu, močoviny a iných derivátov [48].

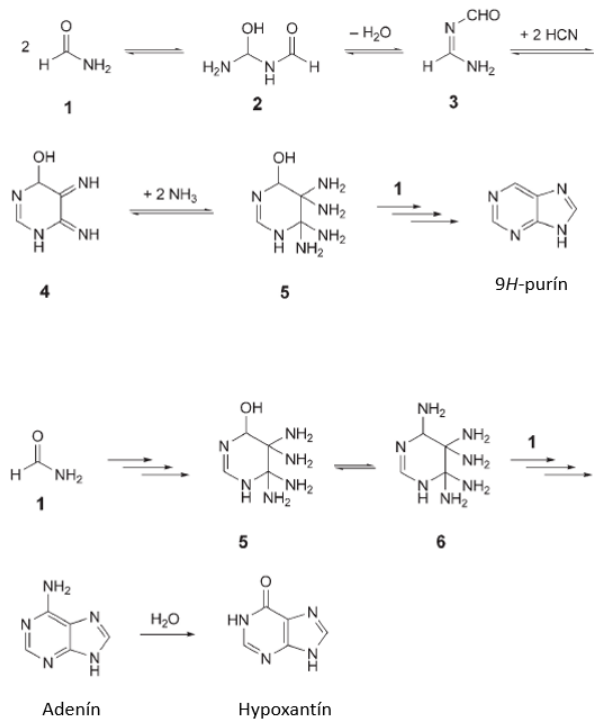
2.5. Syntéza nukleových bází

Najväčší problém akumulovania nukleových bází v rannom štádiu Zeme je v ich degradačných rýchlostiach pri vysokých teplotách. Predpokladaná teplota Zeme sa pohybovala medzi 80 – 110 °C, lokálne až do 350 °C [8, 49]. Tento predpoklad vedie k záveru, že pôvod života založený na dnešnom štvor-písmenovom kóde, musel prebehnúť veľmi rýchlo (<100 rokov) v relatívne nízkych teplotách a v prítomnosti stabilizačných mikroprostredí [45].

2.5.1. Syntéza purinových bází

Formamid má unikátne vlastnosti umožňujúce jeho kondenzáciu do purinových a pyrimidinových bází jednoduchým zahriatím na 110 – 160 °C v prítomnosti katalyzátorov oxidov kovov a minerálov. Purín vzniká aj pri zvýšenej teplote v neprítomnosti katalyzátoru [50]. Počas kondenzačných procesoch v prítomnosti minerálnych fosfátov vzniká popri cytozíne, uracile, adeníne a hypoxantíne v značnom množstve aj najjednoduchšia α -aminokyselina glycín [42].

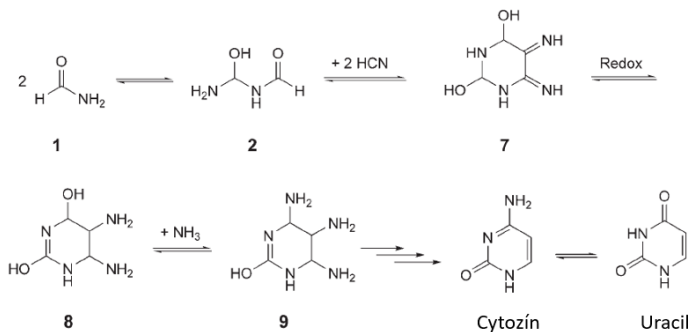
Ako vidieť na obrázku č.2.2 dimer formamidu (**2**) je kľúčovým intermediátom v prvom kroku kondenzačného procesu. Táto zlúčenina stratením vody sa transformuje na N-formyl-formamidín (=N-(iminomethyl)formamid; **3**), ktorý môže následne reagovať s dvoma molekulami HCN za vzniku 1, 4, 5, 6-tetrahydro-5, 6-diiminopyrimidin-4-ol (**4**). Prídavkom amoniaku vzniká intermediát (**5**). Vstupujúce reagenty HCN a NH₃, sú generované *in situ* termálnou dekompozíciou a hydrolýzou formamidu. V syntéze adenínu prebieha nukleofilná substitúcia hydroxylovej skupiny intermediátu (**5**) amoniakom za vzniku medziproduktu (**6**), ktorý následne polymerizuje na adenín [23, 51, 52]. V tejto reakčnej dráhe je hypoxantín pravdepodobne formovaný hydrolytickou deamináciou adenínu. Pyrimidinové jadro vzniká z formamidu ako prvé v syntéze purinových nukleobází. Z tohto dôvodu môžu byť označované tieto syntézy ako cesty pyrimidinového kruhu [23].



Obrázek 2.2: Postupná syntéza purinových bází z formamidu [23].

2.5.2. Syntéza pyrimidinových bází

Multifunkčný charakter formamidu je taktiež patrný vo vzniku pyrimidinových nukleových bázach. Reakčná dráha syntézy cytozínu a uracilu je zobrazená na obrázku č.2.3. Mechanizmus vzniku dimeru formamidu (**2**) je identický ako pri vzniku purinových bází. Táto molekula reaguje s dvoma molekulami HCN za vzniku hexahydro-5, 6-diiminopyrimidín-2, 4-diol (**7**). Tento intermediát môže podstupovať vnútornému redoxnému procesu (pravdepodobne disproportionačnou reakciou) za tvorby produktu (**8**). Následne po substitúcii amoniakom poskytuje zlúčeninu (**9**). Potom po úspešných eliminačných a preskupovacích procesoch vzniká cytozín. Po jeho vytvorení môže prebehnúť hydrolýza na uracil s výtazkom závislým na experimentálnych podmienkach [23, 53].



Obrázek 2.3: Tvorba pyrimidinových bází cytozínu a uracilu z formamidu [23].

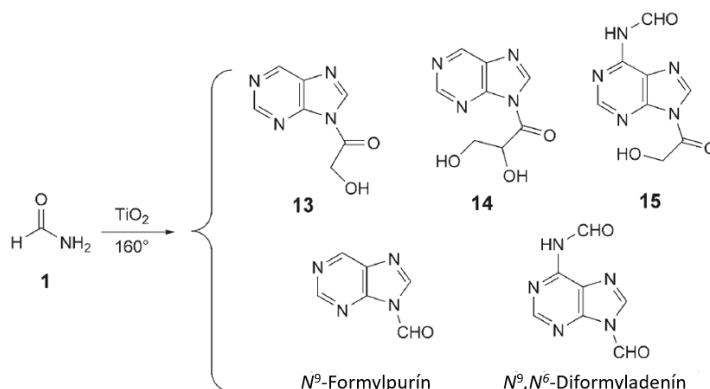
Kovy s rozdielnymi redoxnými potenciálmi umožňujú ladiť syntézu pyrimidinových nukleových bází, modifikovaním účinnosti vnútorného redoxného kroku. Keď je formamid zahrievaný na 160°C v prítomnosti analógov kozmického prachu ako katalyzátora

(bežné terestralne minerály), vznikajú deriváty pyrimidínu, vrátane cytozínu, uracilu, pyrimidin-4(3*H*)-on a 9*H*-purín [26].

2.6. Formózova reakcia - tvorba nukleosidov

Syntéza purínových a pyrimidinových nukleosidov patrí medzi najmenej pochopené aspekty v prebiotckej chémii nukleových kyselín v rannom štádiu Zeme. Nukleosid je zlúčenina obsahujúca nukleovú bázu naviazaná na sacharid - ribóza pre RNA a 2'-deoxyribóza v DNA. V princípe môže syntéza nukleosidov prebehnúť tromi rôznymi reakčnými dráhami. Prvá možnosť je priama formácia glykozidovej väzby medzi už vzniknutou nukleovou bázou a sacharidom. Druhá možnosť pozostáva v konštrukcii nukleovej báze na už vytvorenom sacharide. Tretou možnosťou je tvorba sacharidu na už vzniknutej nukleovej báze. Priama kondenzácia sacharidu a nukleovej báze nemôže prebiehať efektívne v prebiotických podmienkach ani z kinetického, ani z termodynamického hľadiska [11]. Ribóza a nukleová báza sú stabilnejšie ako vzniknutý nukleosid. Vznik N-glykozidovej väzby je endotermný proces, kedy kondenzácia bázi a ribózy je energeticky nevýhodná. N-glykozylácia môže byť exotermný proces, pokiaľ je nasledovaná fosforylačným krokom [54]. Vznik nukleosidu cytidínu prebieha aj napríklad syntézou nukleovej bázy na arabinóze-3-fosfát. Táto reakcia prebieha aj vo vodnom prostredí pri neutrálnom pH [55]. Nukleové bázy boli pravdepodobne vytvorené skôr ako sacharidy, vzhľadom k ich vyššej stabilite. Ribóza musí byť chránená pred degradovaním hneď po jej syntéze [56].

Preto tvorba nukleosidov prebiehala podľa všetkého formovaním ribózy na už existujúcej nukleovej báze cez intermediáty acyklonukleosidov [57]. Na tvorbu acyklonukleosidov musia byť prítomné najmenej dve hydroxylové skupiny, aby mohli vytvoriť acetálovú väzbu. Okrem purínových acyklonukleosidov obsahujúcich bočný reťazec cukru **13-15**, vznikajúcich priamou syntézou počas kondenzácie formamidu, vzniká aj N⁹-formylpurín (=9*H*-purín-9-karbaldehyd) a N⁹,N⁶-diformyladenín (N-(9-formyl-9*H*-purín-6-yl)formamid (obrázok 2.4) [57].



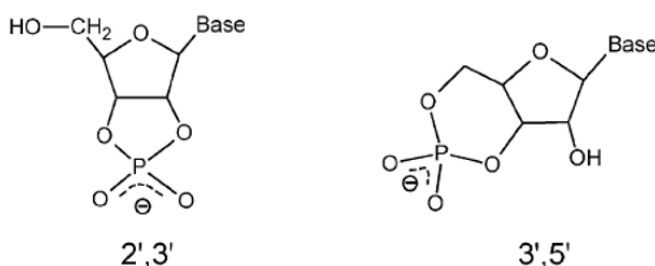
Obrázok 2.4: Acyklonukleosidy vznikajúce z formamidu. Dôležité produkty, z ktorých môžu vzniknúť nukleosidy formózovou reakciou [23].

N-formyl puríny hrajú kľúčovú rolu v tvorbe nukleosidov, vďaka predtvorenej glykosidickej väzbe maskovanej v reaktívnej endocyklickej formylovej (CHO) skupine. Ako bolo uvedené v kapitole chémiu formamidu, formaldehyd, degradačný produkt forma-

midu katalyzovaný TiO_2 , sa môže adovať na elektrofilnú CHO skupinu acyklonukleosidu formózovou kondenzáciou a každým krokom zvyšuje komplexitu acyklického postranného reťazca cukru [58, 59]. Pravdepodobným mechanizmom je tvorba formaldehyd-hydratového aniónu v prítomnosti TiO_2 ako katalyzátoru a následná aktivácia formylovej skupiny [57]. Táto syntéza nukleosidov je založená na tvorbe cukrovej časti priamo na nukleovej báze z jedného spoločného prekursoru. Chémia formamidu nevyžaduje nezávislé syntetické dráhy na cukry a nukleové bázy, ani nevyžaduje prísne podmienky potrebné na vytvorenie glykozidovej väzby [23].

2.7. Fosforylácia a transfosforylácia – vznik nukleotidov

Fosforylácia nukleosidov je v princípe kondenzačná reakcia, ktorá je vo vodnom prostredí z termodynamického hľadiska neefektívna, kvôli kompetitívnej reakcii vody s aktivovanými intermediátmi fosfátov [11]. Preto pravdepodobne fosforylačné reakcie museli prebiehať v suchom prostredí v pevnom skupenstve alebo v bezvodom formamidovom médiu. Optimálna teplota pre priebeh reakcie je 90°C , teploty nižšie ako 60°C sú neefektívne. Vyššie teploty spôsobujú degradáciu vzniknutých produktov. Fosforylácia anorganickým fosfátom, amónnymi soľami, bikarbonátom alebo močovinou, prebieha na všetkých možných pozíciách cukru: 2',3' alebo 5' [60]. V prípade adenosínu fosforylácia prebiehala hlavne na kyslíku v pozícii 5' ribózy formujúc adenosín-5'-monofosfát. Taktiež vznikali 2',3' a 3',5' cyklické formy nukleotidov (obrázok 2.5). Po inkubácii zmesi pri 90°C niekoľko stoviek hodín, cyklické formy nukleotidov má väčšie výťažky, v dôsledku jej vyššej stability vzhľadom k otvorenej forme vo fosforylačných podmienkach. Táto neenzymatická fosforylácia vysvetľuje spôsob formovania a preferenčného akumulovania cyklických nukleotidov, ktoré sú zdrojom prirodzene aktivovaných prekursorov na abiotickú polymerizáciu a vzniku prvých oligomérov RNA [61].



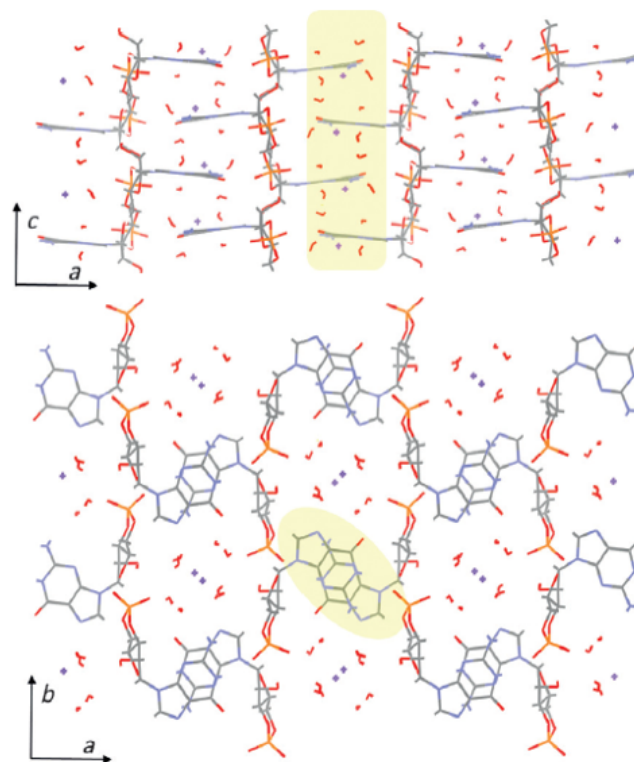
Obrázok 2.5: Nukleosidy 2', 3' a 3', 5'-cyklických fosfátov [39].

2.8. Polymerizácia za neenzymatických podmienok

Krátke sekvencie oligonukleotidov môžu byť ľahko produkované z nukleotidových prekursorov, vytvorením 3', 5'-fosfodiesterovej väzby. Aktivačná energia typickej transfosforylačnej reakcie medzi nukleotidmi za vzniku oligomeru je pomerne vysoká ($35\text{--}40\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) [62]. Na prekonanie tejto energie, nukleotidové monoméry musia byť aktivované pred transfosforyláciou. Energia je zabezpečená exotermickou hydrolýzou cyklickej formy nuk-

leotidu [63], kedy pri oligomerizácii intramolekulárna fosfodiesterová väzba o vysokej energii zaniká za vzniku stabilnejšej intermolekulárnej väzby oligonukleotidu [2]. Tvorba fosfodiesterovej väzby oligonukleotidu je kvôli zmene voľnej Gibbsovej energie spontánna vo vysušujúcich podmienkach, skoro až v suchom prostredí [30].

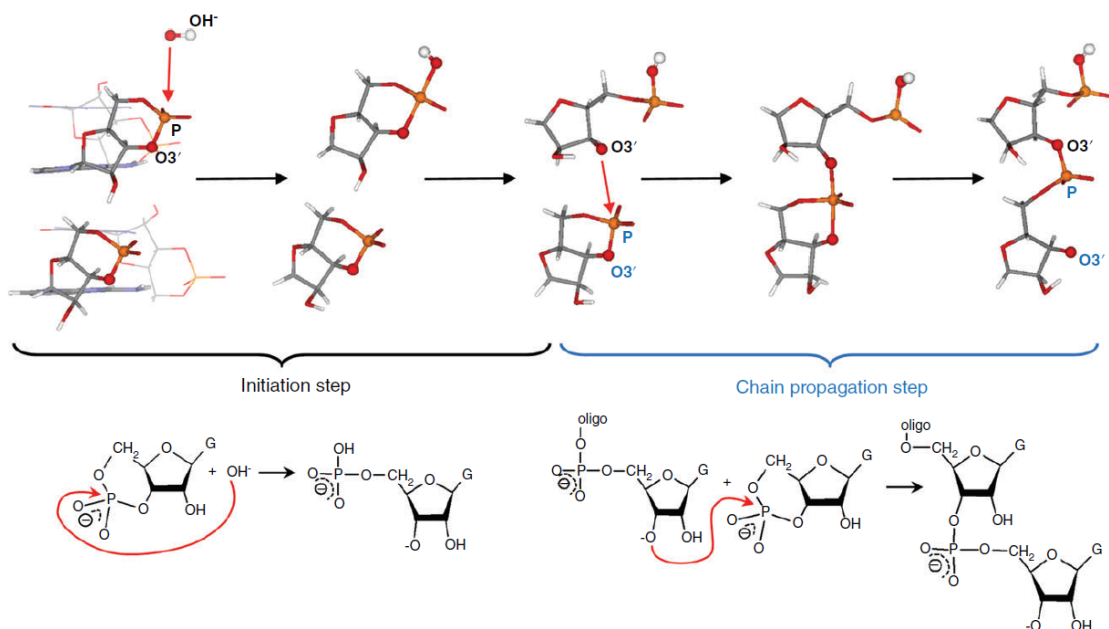
Fosforylačné produkty nukleosidov ako je uvedené v kapitole 2.7 sú nukleotidy obsahujúce jak 2',3', tak 3',5'-cyklické väzby (obrázok 2.5). Transfosforačná reakcia je iniciovaná nukleofilným atakom voľnej hydroxylovej skupiny jedného nukleotidu na fosfor druhého za vzniku 2',5'- a 3',5'-fosfodiesterovej väzby. Selektivita vzniku väzby je daná stericou dostupnosťou fosfátu [64, 65]. Dnešná RNA molekula je avšak spojená po sebe nasledujúcich 3',5'-fosfodiesterovými väzbami. Tento typ väzby vzniká v bazickom prostredí, kedy nukleotidy formujú supramolekulárne štruktúry spôsobené interakciou π - π stacking (obrázok 2.6). Navrstvenie a usporiadanie umožňuje anionovú polymerizáciu s otvorením kruhu cyklického fosfátu. V prvom kroku báza iniciuje nukleofilný atak na jednu fosfátovú skupinu, čo vedie k tvorbe O3'-deprotonovaného nukleotidu. Potom aniónové centrum reaguje s fosforom druhého navrstveného nukleotidu, za vzniku intermolekulárnej fosfodiesterovej väzby. Posledný krok je propagovaný v celej dĺžke navrstvenej sústave, viz. obrázok 2.7 [2].



Obrázok 2.6: Kryštálové vrstveie 3',5'-cyklického GMP. Interbázové stakovanie je zvýraznené žltou farbou - prevzaté z [39].

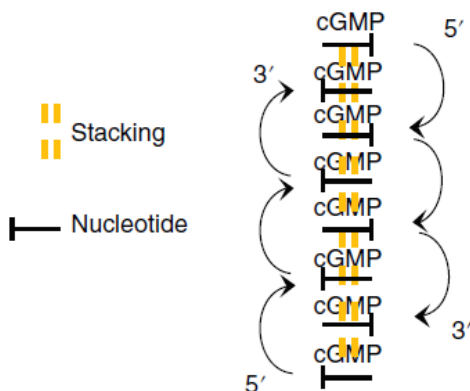
Kryštál nukleotidov je stabilizovaný nekovalentnými interakciami zahŕňajúc všetky tri časti nukleových kyselín – nukleová báza, ribóza a fosfátová skupina. Stacking patrí medzi hydrofóbne a univerzálne interakcie v prebiotickom prostredí, ktoré vydrží aj v polárnom rozpúšťadle [66, 67]. Voľná energia vrstvenia je všeobecne vyššia pri purín-purín interakciách ako v prípade samovrstvenia pyrimidínov, ktoré sú viac stabilizované vodíkovými mostíkmi [68]. Kryštálová štruktúra 2',3' cyklického nukleotidu je naopak najviac stabilizovaná internukleotidovými vodíkovými mostíkmi medzi vodíkom na O5' ribóze a

anionovým kyslíkom fosfátu. Toto usporiadanie znemožňuje regioselektívnej transfosforylácii za vzniku 3', 5'-fosfodiesterových väzieb. Najúčinnějšía je polymerizácia 3', 5'-cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP), kedy sa prejavuje obmedzená mobilita v navrstvovej konformácii nukleotidov. Deprotovaný nukleotid je vhodne umiestnený pre iniciáciu nukleofilného útoku ďalšieho nukleotidu v štruktúre a udržuje sa krok propagácie za vzniku dlhších oligomérov [67, 69]. Vznik oligomérov zo zmesi rozličných nukleotidov je možný len za predpokladu silnej interbázovej vrstviacej interakcie, ktorá stabilizuje štruktúru a umožňuje priebeh transfosforylačných reakcií [67].



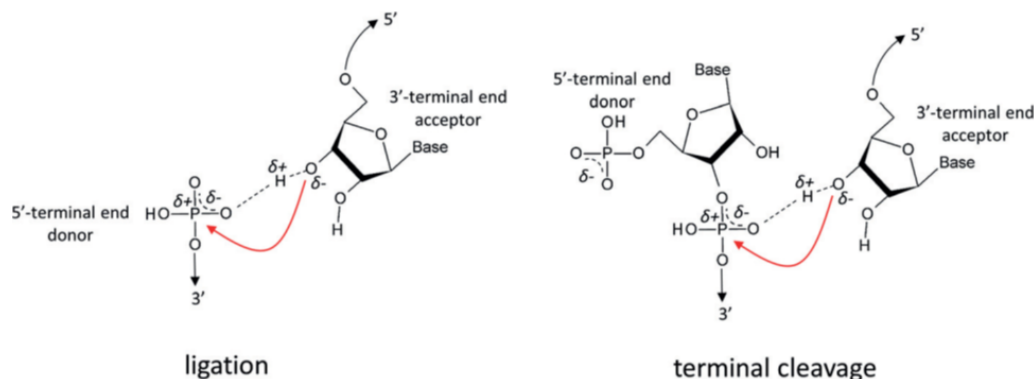
Obrázek 2.7: Mechanizmus polymerizácie s otvorením kruhu 3', 5'-cyklického GMP predpovedaný na základe pokročilých výpočtov elektronickej štruktúry [2, 67].

Polymerizácia 3', 5'-cyklického GMP, otvára aj možnosť jednoduchšej replikačnej dráhy. Model polymerizácie založený na stabilizácii štruktúr stackingom je ukázaný na obrázku 2.8. Oligomerizácia nukleotidov na pravej strane vrstvy je katalyzovaná nukleotidmi na ľavej strane a naopak. Pokiaľ pravá strana oligomerizuje rýchlejšie, potom syntetizovaný oligomer môže slúžiť ako templát a podporovať transfosforylačné reakcie na ľavej strane medzi cGMP a naopak [67].



Obrázek 2.8: Symetria navrstvovej štruktúry formujúca z 3', 5' cGMP umožňuje transfosforylačné reakcie medzi ľavou a pravou stranou nukleotidov [67].

Oligonukleotidy môžu interagovať aj nekovalentne vodíkovými mostíkmi a vytvárať tak stabilné páry bází, podľa základných Watson-Crickových pravidiel komplementarity. Oligonukleotid guanínu sa páruje s cytidínom a slúži ako štrukturálny templát a podpora pre spontánnu oligomerizáciu 3', 5'-cCMP [67]. Stacking spolu s vodíkovými mostíkmi umožňujú vytvorenie štruktúry vlásenky potrebnej pre priebeh ligácie a terminálneho štiepenia komplementárnych sekvencií. Ako vidieť na obrázku 2.10 koncová smyčka vlásenky sa skladá zo 4 bází a asistuje pri štiepení 5'-terminálneho nukleotidu donorového oligonukleotidového vlákna. Potom môže nasledovať terminálna rekombinácia 3-konca iného akceptora, mechanizmom naznačeným na obrázku 2.9. Tento proces sa označuje ako ligácia po intermolekulárnom štiepení (ligation after intermolecular cleavage – LIC). Spájanie komplementárnych vlákien umožňuje zvýšenie komplexity oligonukleotidov tvorbou zmiešaných sekvencií oligonukleotidov [39, 70]. 3'-terminálna hydroxylová skupina akceptora zapojená do transfosforylačnej reakcie, formuje stabilný vodíkový mostík s terminálnym alebo subterminálnym fosfátom donora. Táto interakcia presúva parciálny pozitívny náboj na fosfor fosfátu a aktivuje ho pre transfosforylačnú reakciu vedúcu k ligácii alebo terminálnemu štiepeniu.

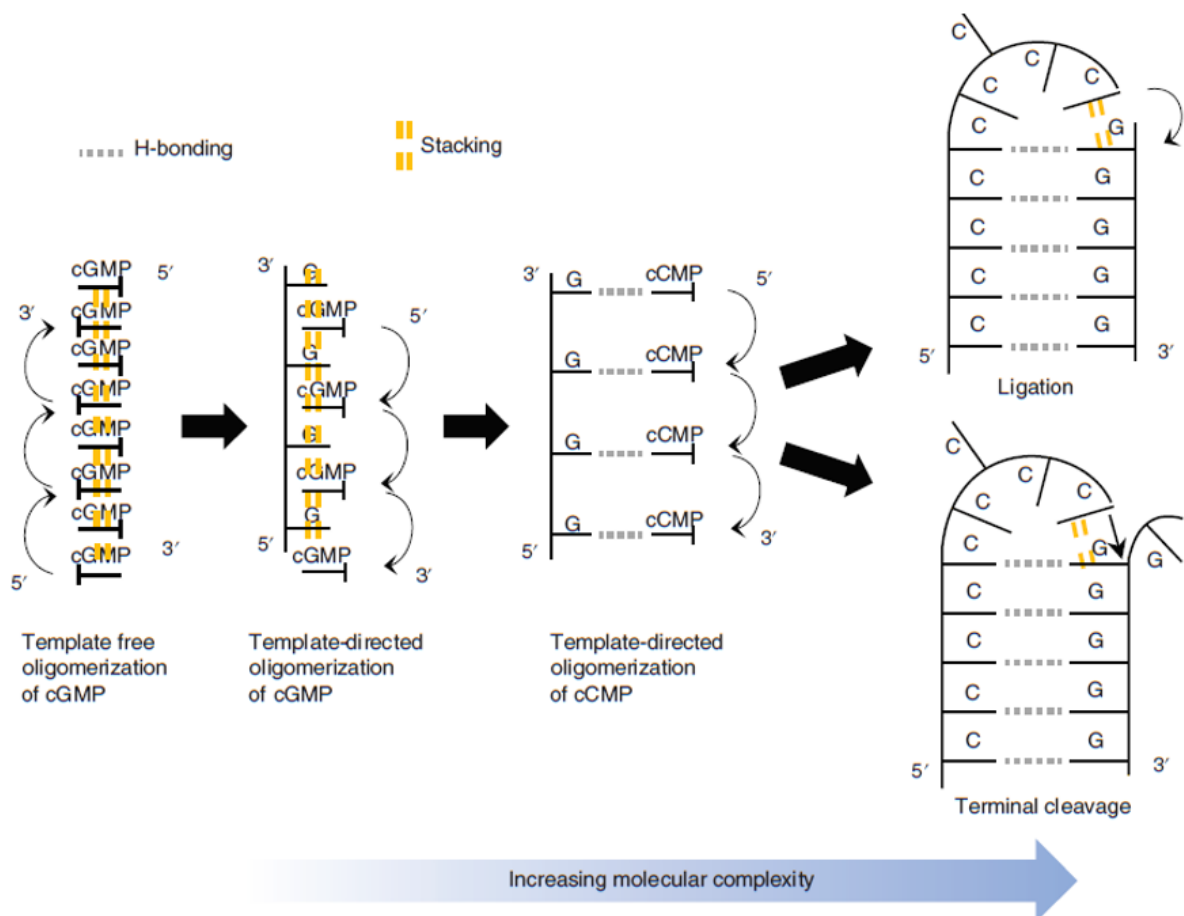


Obrázek 2.9: Aktivácia 3'-koncovej hydroxylovej skupiny akceptora počas ligácie a terminálny štiepiaci krok v LIC reakcii [39].

Ďalší spôsob štiepenia terminálneho nukleotidu donora je jeho aktivovanie na O2' externou bázou. Toto vedie k intramolekulárnej hydrolyze, ktorá môže byť nasledovaná terminálnou rekombináciou vlásenky, čo vedie k rovnakému produktu ako v prípade LIC reakcie - zmiešaných sekvencií oligonukleotidov. Tento mechanizmus môže byť považovaný ako najlahšia a najstaršia forma RNA katalýzy [39, 71].

V rámci výskumu počiatku života sa od prvých experimentov Oparina, Millera a Ureaya spravil veľký pokrok. Na základe súčasných experimentálnych výsledkov sa na ceste k vytvoreniu samoreplikujúcich RNA molekúl za podmienok simulujúcich podmienky mladej Zeme, nie sú známe žiadne neprekonateľné prekážky. Dosiahnutie laboratórnej abiogenézie je v dnešnej dobe skôr otázkou optimalizácii podmienok [67].

Na optimalizáciu podmienok vzniku prvých samoreplikujúcich RNA molekúl sú potrebné presné analytické metódy. Na analýzu neenzymatickej polymerizácie 3', 5'-cGMP sa používa gelová elektroforéza a hmotnostná spektrometria [72]. Ďalšou metódou na charakterizáciu vznikajúcich oligonukleotidov, môže slúžiť rovnako aj elektrochemická analýza.



Obrázek 2.10: Hydrofóbne interakcie (stacking) umožňujú oligomerizáciu 3', 5'-cGMP. Vznikajúce oligómery potom mohli slúžiť ako templáty pre ich samotnú replikáciu. Okrem toho, vodíkové mostíky medzi oligoG templátmi a 3', 5'-cCMP indukujú formáciu oligoC sekvencií. Kombináciou interakcií vrstvenia a vodíkových mostíkov mohlo viesť k ligácii a terminálnej rekombinácii medzi oligoG a oligoC sekvenciami, produkujúc zmiešané oligonukleotidy obsahujúce guanozín a cytidín [67].

2.9. Elektroanalytická chémia

V elektrochemických systémoch sa skúmajú procesy a faktory, ktoré ovplyvňujú prenos náboja medzi elektródou a elektrolytom. Elektrochemické deje sa odohrávajú na rozhraní elektródy a elektrolytu pri vložení definovanom napätí na elektródu. Náboj na elektróde sa prenáša pohybom elektrónov (a dierami). Ako elektródy sa používajú pevné kovové vodiče, alebo tekuté kovy – ortuť, uhlík (v sp² aj sp³ usporiadaní) a polovodiče. V elektrolyte je náboj prenášaný pohybom iónov. Najčastejšie využívané elektrolyty sú vodné roztoky obsahujúce ióny [73].

Elektroanalytické deje prebiehajú v elektrochemickej cele, skladajúcej sa zo sústavou najmenej dvoch elektród ponorených v elektrolyte, medzi ktorými sa meria rozdiel potenciálov pomocou voltmetru. Častejšie využívaným spôsobom elektroanalýzy je postup, kedy je na elektródy vložený potenciál a meria sa prúd pretekajúci pracovnou elektródou. Na rozhraní medzi prostrediami elektróda/elektrolyt sa vyskytuje silné elektrické pole, ktoré ovplyvňuje chovanie nabitých častíc (elektrónov a iónov). Chemická reakcia prebiehajúca v cele sa skladá z dvoch nezávislých polreakcií, ktoré popisujú chemické

zmeny na elektródach. Každá polreakcia zodpovedá medzifázovému rozdielu potenciálov na danej elektróde. Väčšinou sa sleduje polreakcia len na jednej elektróde, ktorá sa nazýva pracovná. Pre sledovanie dejov na pracovnej elektróde je potrebné, aby druhá polovica elektrickej cely bola normalizovaná pomocou referenčnej elektródy tvorenej fázami, ktoré majú v podstate konštanté zloženie. Referenčná elektróda v dvojelektrodovom zapojení je štandardizovaná, nedochádza u nej ku polarizácii a má konštantý potenciál. Medzinárodne uznávaným primárnym štandardom je vodíková elektróda (Pt/H₂/H⁺ - platinová elektróda nasýtená vodíkom pri parciálnom tlaku 101,325 kPa, ponorená do roztoku kyseliny s jednotkovou aktivitou hydroxóniových kationov). Potenciál tejto elektródy je podľa dohody rovný nule. Ďalšie referenčné elektródy ako argenochloridová elektróda (Ag/AgCl/nasýtený vodný roztok KCl), majú oproti vodíkovej elektróde potenciál posunutý v prípade Ag/AgCl/KCl o 0,197 V [73].

Väčšina elektrochemických experimentov prebieha na trojelektrodovom systéme, kedy sa využíva navyše pomocnú elektróda. Prúd v takomto systéme prechádza medzi pracovnou a pomocnou elektródou neovplyvňujúc referenčnú elektródu, čo spresňuje výstupné dáta. Ako pomocné elektródy sa využívajú inertné látky (napr. Pt). Platinové elektródy neproduktujú elektrolýzou zlúčeniny, ktoré by mohli ovplyvniť prebiehajúce reakcie na pracovnej elektróde [73]. Všetky hodnoty potenciálov v tejto práci sa vzťahujú ku referenčnej elektróde Ag/AgCl/KCl.

Dosiahnutím kritickej energie potrebnej k prenosu elektrónu do prázdnych orbitálov častíc v elektrolyte, dochádza k toku redukčného prúdu z elektródy do analyzovanej látky. Zavedením pozitívnejšieho potenciálu na pracovnú elektródu sa znižuje energia elektrónov, kedy pri kritických potenciáloch elektróny prechádzajú z častíc v elektrolyte na elektródu (oxidačný prúd). Kritické potenciály, pri ktorých tieto procesy prebiehajú, súvisia so štandardnými potenciálmi (E₀) analyzovaných elektroaktívnych látok. Závislosť prúdu na napätí sa zaznamenáva ako voltametrická krivka, na ktorej sa oxidácia alebo redukcia látky registruje ako pík na voltamograme. Pozícia píkov je špecifická pre každú elektroaktívnu látku [73].

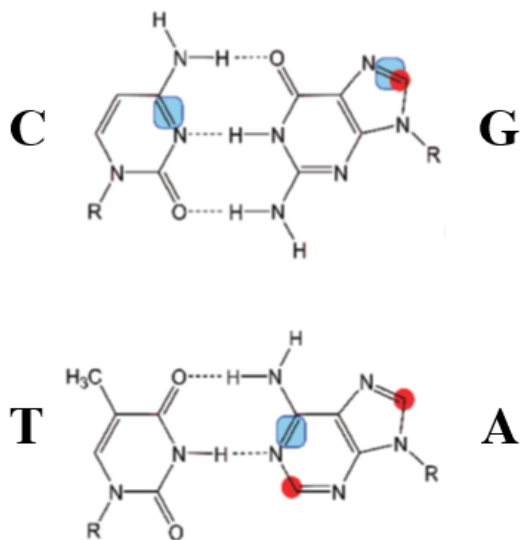
Potenciálová pozícia píkov je špecifická pre každú elektroaktívnu látku a plocha píkov (umerná prešlému prúdu) zodpovedá za prenos elektrónov cez rozhranie elektróda/elektrolyt v dôsledku prebiehajúcej reakcie oxidácie alebo redukcie. Počet prechádzajúcich elektrónov a veľkosť prúdu je závislý na stechiometrii chemickej reakcie. Celkový prechádzajúci náboj sa meria v jednotke coulomb (C, kedy jeden C zodpovedá $6,24 \cdot 10^{18}$ elektrónov). Prúd je rýchlosť prúdenia elektrónov (coulombov), kedy 1 ampér (A) je rovný $1 \text{ C} \cdot \text{s}^{-1}$ [73].

V modernej elektrochemickej analýze sa používajú viaceré voltametrické techniky. Tieto techniky sledujú závislosť prúdu prechádzajúceho pracovnou elektródou ponorenou v analyzovanom roztoku na potenciáli, ktorý je na túto elektródu vkladajú z vonkajšieho zdroja. Lineárna voltametria je najjednoduchšia metóda využitá v tejto práci, kedy sa potenciál vkladajú na elektródu lineárne mení s časom (rastie alebo klesá) [74]. Voltametrické techniky sú vhodné nielen k analýze kovových iontov, ale je možné s nimi sledovať spektrum organických látok a biologických makromolekúl o veľmi nízkych koncentráciách vrátane RNA a DNA. Technikou LSV je možné elektrochemicky analyzovať oligonukleotidy RNA nachádzajúcich sa v nadbytku cGMP.

2.9.1. Elektrochémia DNA

Elektrochémia DNA sa začala vyvíjať v polovici 20. storočia. Nukleové kyseliny sú elektroaktívne látky, ktorých vlastnosti je možné analyzovať elektrochemickými metódami [75]. Merania sú založené najčastejšie na zmenách elektrického prúdu vznikajúceho po interakcii nukleových kyselín s elektricky nabitými povrchmi ortuťovej alebo uhlíkovej elektródy [1]. Vo vývoji DNA senzorov boli zavedené aj platinové, zlaté, strieborné, medené a cínom dopované elektródy z oxidu inditého. Obmedzenie využitia týchto elektród je v rozsahu ich potenciálového okna, kedy vo vodnom prostredí pri určitej hodnote potenciálu dochádza k rozkladu elektrolytu, alebo elektrochemickému rozpúšťaniu materiálu elektródy. Vlastnosti elektrolytu a elektródy ovplyvňujú hodnoty potenciálov, kedy dochádza k tomuto javu. Rozsah potenciálov umožňuje merať na ortuťových elektródach prevažne redukčné deje (ktorá sa pri mierne pozitívnych potenciáloch rozpúšťa). Oproti tomu väčšia pevných elektród sú vhodnejšie na merania oxidačných dejov [76].

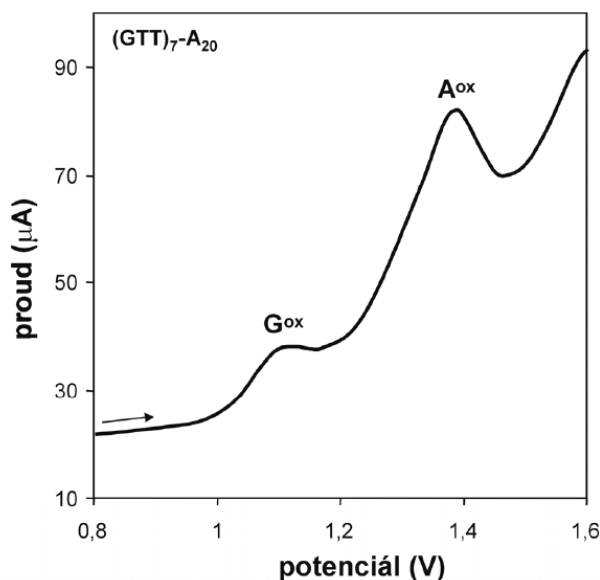
Elektroaktívnou zložkou nukleových kyselín sú dusíkaté báze. V elektrochemických analýzach je možné rozlíšiť redukciu všetkých báz vrátane uracilu a metylovaného cytozínu [77]. Oxidovateľné sú všetky báze, ale najviac využívané v elektrochemických analýzach sú oxidačné signály A a G, keďže oxidácia pyrimidinov prebiehajúca vo vysoko pozitívnych potenciáloch, mimo rozsah potenciálového okna väčšiny používaných elektród [78].



Obrázek 2.11: Primárne redukčné miesta A a C (modrý obdĺžnik) sú zo stérických dôvodov horšie prístupné ku redukcii. Primárne oxidačné miesta A a G (červený krúžok) nie sú skryté vo vnútri molekuly a môžu sa viac priblížiť k povrchu elektródy [1].

Vo vodnom roztoku je možné pozorovať píky spojených s redukciou báz v neutrálnom až mierne kyslom prostredí na ortuťovej, amalgámovej elektróde [79], alebo elektróde z pyrolytického uhlíku [77]. Nukleové báze A a C sa redukujú v podobnom potenciále okolo $-1,45$ V a poskytujú spoločný CA pík. G na ortuťovej elektróde poskytuje oxidačný signál, označovaný ako G pík s potenciálom okolo $-0,3$ V. Jedná sa o spätnú oxidáciu redukčného produktu G, ktorá vzniká v príliš záporných potenciáloch (menej ako $-1,6$ V). Na elektróde z PGE je možné pozorovať jak spätnú oxidáciu G pri anodickom skene, tak aj pík spojený s priamou redukciou G pri potenciále okolo $-1,8$ V. V obdobných potenciáloch sa na PGE nachádzajú aj píky spojené s priamou redukciou T a U [77].

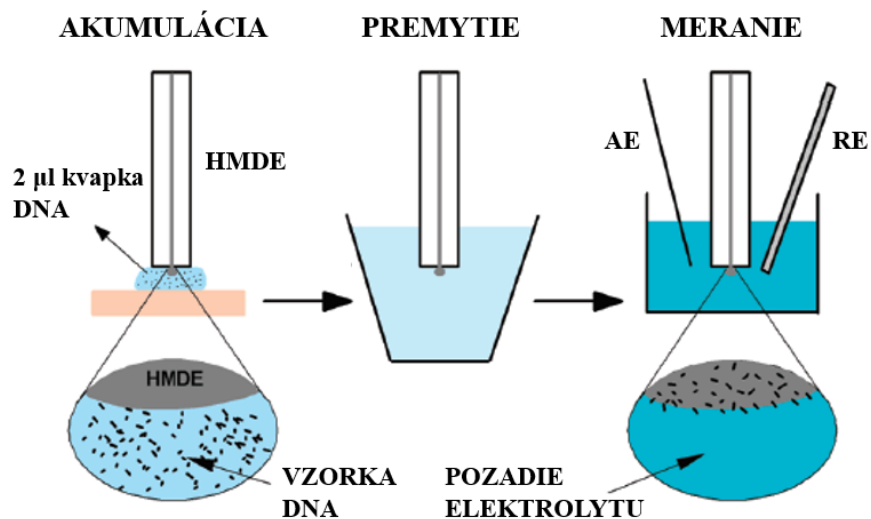
Pri vložení potenciálu nad $+0,1\text{ V}$ dochádza k rozpúšťaniu ortute. Z tohto dôvodu sú oxidačné signály poskytované nukleovými bázami vo vysoko pozitívnych potenciáloch merané na pevných elektródach. Uhlíkové elektródy umožňujú meranie v potenciáloch, kedy dochádza k oxidácii báz, z ktorých je najčastejšie využívaný oxidačný signál purínov G a A, označovaných ako G^{ox} a A^{ox} (obrázok 2.12), pretože sú oxidované zo všetkých nukleových báz pri najnižšom potenciále. Merania vo vyšších potenciáloch sú zatažené oxidačným prúdom vzniknutým rozkladom elektrolytu. Oxidácia purínov prebieha cez radikálové intermediáty za vzniku zmesi produktov závislých na pH a priestorovom usporiadaní purinových zbytkov na povrchu elektródy [80, 81, 82].



Obrázok 2.12: Voltamogram oligonukleotidu s oxidačnými píkmi guanínu (G^{ox}) okolo $1,1\text{ V}$ a adenínu (A^{ox}) okolo $1,4\text{ V}$ nameraný na elektróde z pyrolytického grafitu [76]

Pre zvýšenie citlivosti detekcie DNA a RNA je možné využiť rozpúšťacích technik ako AdS (adsorptive stripping) a AdTSV, (adsorptive transfer stripping voltammetry) [83]. AdS je metóda, ktorá využíva silnú adsorpciu nukleových kyselín na povrch ortuťovej elektródy počas meranie v elektrochemickej cele [1]. AdTSV je založená na zakoncentrovaní analytu na povrchu elektródy z iného roztoku, ako v ktorom sa prevádza samotné meranie, kedy sa následne elektróda prenáša do elektrolytu neobsahujúceho analyt (obrázok 2.13 [83]). Nukleové kyseliny sa adsorbujú na povrch ortuťovej a uhlíkovej elektródy vďaka silným hydrofóbnym interakciám nukleových báz. Zvýšením koncentrácie kationov Na^+ dochádza ku odtieneniu nábojov, čo umožňuje aj silnejšiu adsorpciu cukor-fosfátovej kostry DNA na povrch elektródy [84]. Elektrochemické meranie adsorbovaných nukleových kyselín prebieha po opláchnutí destilovanou vodou v meracej cele v základnom elektrolyte neobsahujúceho príslušný analyt. Hydrofóbné interakcie medzi povrchom elektródy a nukleových báz je dostatočne silná, že vydrží výmenu média [83]. Tento postup má pri analýze DNA alebo RNA radu výhod. Jednou z nich je možnosť jednoduchého odstránenia interferujúcich látok, ktoré sa vyskytujú v pôvodnom vzorku, ale neadsorbujú sa na povrch elektródy alebo sa na neho adsorbujú podstatne slabšie ako DNA. Ďalšia technika výhodná v potenciáloch, kde dochádza k rozkladu elektrolytu je base-line korekcia

s pohyblivým priemerom, ktorá je efektívna pri analyzovaní aj malých píkov nukleobází [85].



Obrázek 2.13: Zjednodušená schéma AdTS na ortuťovej elektróde (HMDE). Metóda umožňuje použitia malého objemu vzorku, kedy sa DNA adsorbuje z malej 2 μl kvapky. Naadsorbovaná DNA následne vydrží premytie. Toto umožňuje selektne analyzovať nukleové kyseliny podľa sily adsorpcie na povrchu elektródy. Samotné meranie prebieha v elektrolyte (neobsahujúceho analyt). Táto technika je aplikovateľná aj na uhlíkové elektródy [1].

Elektrochemické vlastnosti nukleových kyselín závisia aj na ich štruktúre. Ako vidieť na obrázku 2.11 primárne redukčné miesta A a C na ortuťovej elektróde sa nachádzajú vo vnútri dvojzávitnice DNA a sú súčasťou Watson-Crickovho systému vodíkových väzieb. Primárne redukčné miesto G na ortuťovej elektróde, rovnako ako primárne oxidačné miesto G a A na uhlíkovej elektróde, nie sú zahrnuté vo vodíkových väzbách, čo im umožní viac sa priblížiť k povrchu elektródy. Pravdepodobne preto na uhlíkových elektródach, je pozorovaný malý rozdiel medzi signálom G v jednoreťazcovej DNA a v dvojzávitnici [1].

Pomocou voltametrie so striedavým prúdom (ACV, AC voltammetry) je možné pozorovať, že v prípade dsDNA sa v širokom rozmedzí potenciálov významne nemení jej štruktúra. Až pri potenciáloch okolo $-1,2\text{ V}$, dochádza k odvíjaniu dvojzávitnice na jej voľných koncoch [86]. Elektrochemické merania môžu poskytovať informácie o interakcii DNA s elektricky nabitými povrchmi. Pri ACV je možné pozorovať sériu signálov, ktoré súvisia s adsorpciou/desorpciou a reorientáciou molekúl DNA na nabitom elektródovom povrchu. V oblasti potenciálu okolo $-1,2\text{ V}$ dochádza ku desorpcii cukor-fosfátovej kostry DNA. K desorpcii molekúl ssDNA (alebo jednoreťazové úseky v dsDNA) adsorbovaných na povrchu elektródy prostredníctvom bází, dochádza pri negatívnejších potenciáloch okolo $-1,4\text{ V}$ [76].

3. Experimentálna časť

3.1. Materiály

3.1.1. Chemikálie

- Akryl amid 40%
- Tetrametylendiamin (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin)
- Peroxodisíran amónny
- Kyselina boritá
- EDTA (Sigma)
- Kyselina octová (Sigma)
- Acetát sodný (Sigma)
- Hydrogénfosforečnan sodný (Sigma)
- Hydroxid sodný (Sigma)
- Močovina (Fluka)
- Tris x-100 (Sigma)
- Tween 20 (Fluka)
- SDS
- cGMP
- Izotop γ - ^{32}P -ATP (Empowered Discovery)

3.1.2. Pufre a elektrolyty

- TBE 10x: 108 g Tris p.a., 55 g H_3BO_3 , 0,5 M EDTA, doplnené destilovanou vodou do 1 l
- Nanášací pufor pre polyakrylamidovú gélovú elektroforézu (PAGE): 80 % formamid, 10 mM EDTA, 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bromfenylová modrá
- Acetátový elektrolyt (pH 5): 0,2 M acetát sodný, 0,2 M kyselina octová v pomere 14 : 6 (pH 5)
- Fosfátový pufor (pH 12): 100 ml 0,05 M Na_2HPO_4 , 53,8 ml 0,1 M NaOH

3.1.3. Vzorky RNA

- Oligonukleotid rG₄ (Biomers)
- Oligonukleotid rG₉ (Biomers)
- Preliminárne vzorky produktov neenzymatickej polymerizácie 3', 5' cGMP (laskavo poskytnuté pre predbežné experimenty Judit E.Šponerovou, Ph.D.)

3.1.4. Enzymy a príslušné pufre

- T4 polynukleotid kináza (T4 PNK) (Biolabs)
- PNK pufor (Biolabs)

3.1.5. Elektródy

- Elektróda z pyrolytického grafitu (PGE, pyrolytic graphite electrode)
- Elektróda z platinového drátu (pomocná elektróda)
- Elektróda Ag/AgCl/nasýtený vodný roztok KCl (referenčná elektróda)

3.1.6. Prístroje

- Minispin centrifugy (Eppendorf)
- Thermomixer (Eppendorf)
- Autolab (Methrom)
- VA-stand 663 (Methrom)
- Phosphorimager Storm 860 (Molecular dynamics)
- Laboratórna váha PCB 2500 – 2 (Kern)
- Potenciostat a galvanostat PGSTAT302N (Metrohm-Autolab)

3.1.7. Software

- Nova 1.11
- Typhoon 9000

3.2. Metódy

3.2.1. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metóda pre separáciu a analýzu makromolekúl (DNA, RNA a proteínov) v závislosti na ich veľkosti, usporiadaní a náboji. Jedná sa o druh elektroforézy, ktorý využíva gel o rôznych veľkosti pórov, cez ktoré sa fragmenty makromolekúl pohybujú. Na krátke oligonukleotidy bol použitý polyakrylamidový gél, ktorý zlepšuje rozlíšenie v menšom rozsahu dĺžok RNA molekúl.

Denaturačný 20% polyakrylamidový gél obsahujúci 1 x TBE (pH 8) a 7M močoviny. Rádioaktívne značené vzorky boli zmiešané s nanášacím pufrom (80% formamid, 10mM EDTA, 1 mg·ml⁻¹ bromfenolová modrá) a následne boli nanesené na gél. Separácia prebiehala pri 1100 V po dobu 50 minút.

3.2.2. Rádioaktívne značenie oligonukleotidov izotopom ³²P

Bolo využité rádioaktívne značenie pre detekciu RNA oligonukleotidov na denaturačnom PAGE. K značeniu bol využitý protokol využívajúci polynukleotid kinázu T4 (T4 PNK). Tento enzým katalyzuje pripojovanie γ fosfátu z ATP k 5' koncu DNA alebo RNA. Pri použití γ -³²P značeného ATP bol získaný 5' ³²P značený oligonukleotid.

Pre reakciu bol zvolený celkový objem reakcie 5 μ l, vzniklé oligonukleotidy pri neenzymatickej polymerizácii z cGMP, 0,1 μ l ³²P ATP, 0,05 μ l T4 PNK a 0,5 μ l príslušného pufru. Reakcia prebiehala pri 37 °C 30 minút.

3.2.3. Adsorptívna prenosová technika

AdTS je technika založená na adsorpcii analytu na povrch elektródy. Adsorpčná sila nukleových kyselín na uhlíkovej elektróde je natoľko silná, že vydrží výmenu média, v ktorom prebieha samotné meranie [90]. Táto technika bola použitá pre analýzu roztokov 500 μ M cGMP, oligonukleotidov rG₉ a rG₄. Taktiež boli pripravené a analyzované zmesné roztoky oligonukleotidov v 500 μ M cGMP. Adsorpcia vzorku na povrch PGE sa prevádzala z 2 μ l kvapky 0,3M roztoku NaCl po dobu jednej minúty. Elektróda bola následne premytá za stáleho miešania v detergente (Triton x-100, SDS a Tween 20), alebo selektívna desorpcia cGMP bola prevádzaná pomocou vloženého záporného a kladného potenciálu na PGE v acetátovom (pH 5) a fosfátovom (pH 12) pufre. Potom bola elektróda prepláchnutá v destilovanej vode, vložená do elektrochemickej cely a bola prevedená elektrochemická analýza lineárnym skenom od 0 V do 1,6 V v 0,2M acetátovom pufre o pH 5. Pred každým meraním bol povrch PGE očistený, strhnutím najvyššej vrstvy uhlíku pomocou lepiacej pásky [77].

3.2.4. Elektrochemické meranie

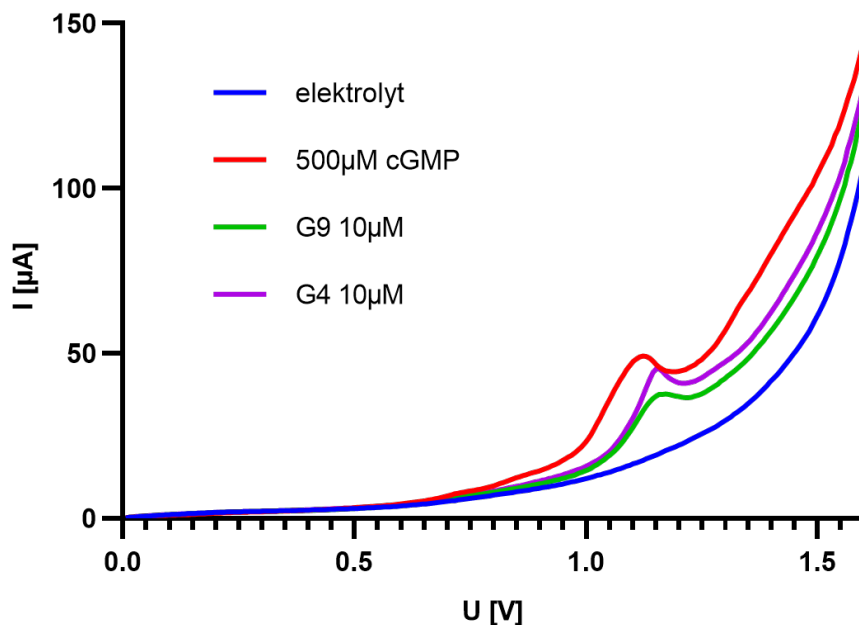
Meranie bolo prevádzané pomocou trojelektrodového systému. Pomocná elektróda bol platinový drôt, referenčná elektróda bola argentochloridová (Ag/AgCl/KCl) a pracovná elektróda PGE. Elektródy boli pri meraní ponorené v 0,2M acetátovom elektrolyte (pH 5). Zmenu elektrických potenciálov v čase bol zaisťovaný Autolabom, ktorý bol nastavený cez program NOVA. Elektrochemické meranie bolo prevádzané lineárnou voltametriadou

(LSV). Pri lineárnej voltametrii (LSV) sa sleduje prúd na pracovnej elektróde, kedy sa potenciál lineárne zvyšuje v čase [74]. Na namerané data bola použitá base-line korekcia.

4. Výsledky a diskusia

4.1. Elektrochemická analýza produktov neenzymatickej polymerizácie 3',5' cGMP

Vzorky neenzymatickej polymerizácie 3',5' cGMP simulujúce vznik krátkych oligonukleotidov RNA v prebiotických podmienkach [2], obsahujú samotné produkty oligomerizácie - RNA, ako aj nezreagovaný cGMP. Ako vidieť na obrázku 4.1 báza G v reťazci RNA poskytuje na PGE oxidačný pík (G^{ox}) v podobných potenciáloch, ako príslušný mononukleotid cGMP. V prípade, že sa cGMP vyskytuje v analyzovanom roztoku vo zmesi s RNA oligonukleotidom, výsledný pík G^{ox} je zložený z príspevkov obidvoch zložiek zmesi a je veľmi obtiažne ich od seba odlíšiť. Z tohto dôvodu je nutnosť pred elektroanalýzou použiť separačnú metódu. Často používané spôsoby preparatívnej separácie oligo a monomérov sú etanolová precipitácia a purifikácia prostredníctvom komerčných silikagelových kolón. Obe metódy môžu viesť ku stratám najkratších oligomérov [87], ktorých fyzikálne vlastnosti sú pre účely separácie veľmi blízke monomerným jednotkám. Táto selektívna strata potom môže skresľovať výsledky, kedy sledujeme vyššie zastúpenie dlhších reťazcov. Na analýzu a kvantifikáciu vzoriek obsahujúcich oligonukleotidy popri mononukleotidom sa využíva gelová elektroforéza, ktorá umožňuje separáciu RNA líšiacej sa už o 1 nukleotid.



Obrázek 4.1: Voltamogramy s oxidačným píkom guanínu G^{ox} pri 1,1 V nameraným na PGE. Pri zmesných vzorkách oligonukleotidov guanínu a cGMP dochádza k prekryvu signálu, čo znemožňuje ich analýzu popri sebe.

Cielom tejto práce je vyvynutie a optimalizácia metódy charakterizujúcej RNA oligoG reťazcov prítomných v zmesi s cGMP, ktorá využíva odlišnú silu adsorpcie k povrchu PGE. Analýza je založená na selektívnom odstránení cGMP z povrchu elektródy pomo-

cou rôznych detergentov alebo elektrochemických postupov pred prevedením vlastného merania technikou lineárnej voltametrie.

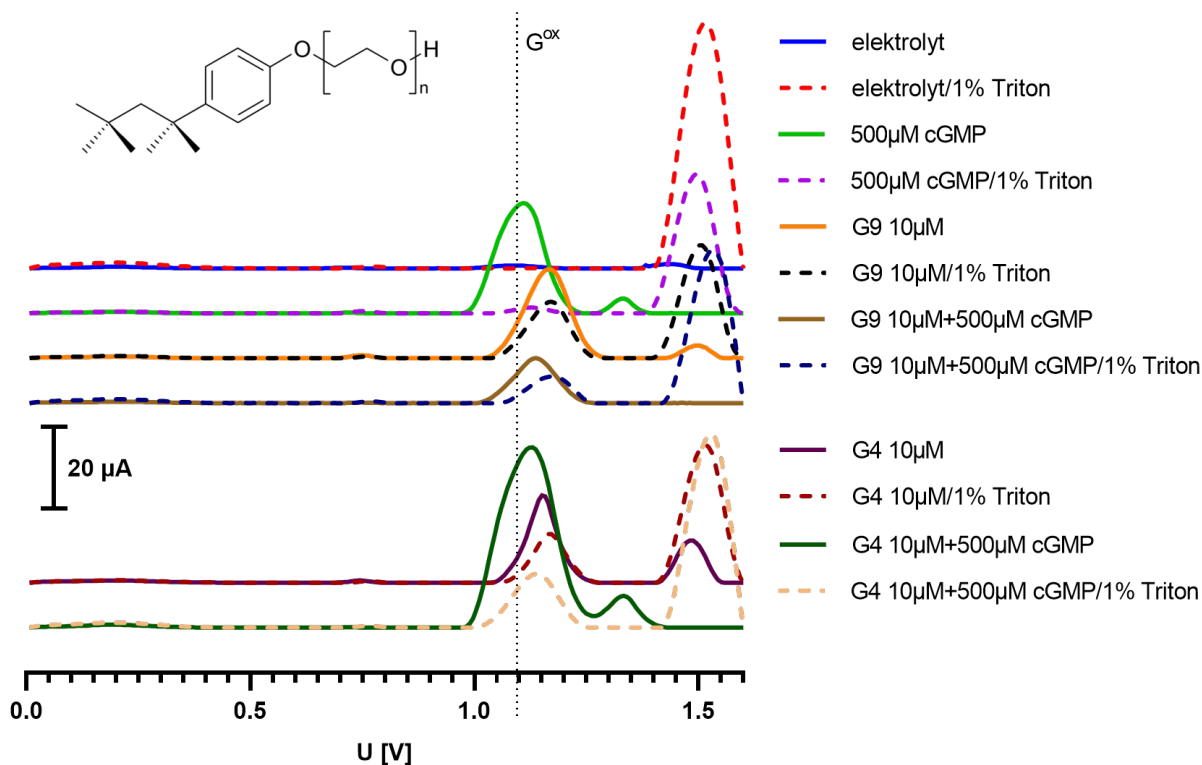
4.2. Selektívna desorpcia cGMP pomocou detergentov

Bola prevedená analýza roztokov $500\mu\text{M}$ cGMP, $10\mu\text{M}$ oligonukleotidov rG₉, $10\mu\text{M}$ rG₄ a ich zmesí. Pre spresnenie analýzy bola využitá base-line korekcia s pohyblivým priemerom. Bol sledovaný pík v oblasti 1,1 V ktorý vzniká oxidáciou G. Veľkosť oxidačného signálu priamo súvisí s množstvom prítomných guaninových bází, ktoré sú naadsorbované na povrchu PGE. Boli použité detergenty Triton x-100, SDS a Tween 20 po dobu 1 minúty. Cieľom bolo selektívne odstrániť cGMP a ponechať RNA oligonukleotidy na základe rozdielnej sily adsorpcie na povrchu PGE. Na obrázku 4.2 je ukázaná molekula Tritonu x-100, ktorá je neionový surfaktant. Skladá sa z dlhej hydrofilnej časti zloženej z polyethylénglykolu a hydrofóbnou skupinou s aromatickým kruhom. Neionogenné detergenty vykazujú orientáciu pri adsorpcii na pevných povrchoch a účinok adsorpcie a desorpcie RNA môže byť úzko spojený so spôsobom, ako sú detergenty orientované na povrchu. Účinok Tritonu x-100 aj ostatných neionových detergentov na desorpciu RNA môže byť spôsobený aj vytvorením difúznej vrstvy na rozhraní povrchu elektródy, čím snižuje príťažlivé interakcie medzi RNA a povrchom [88]. Počas premývania elektródy detergentom dochádza ku ustanoveniu rovnováhy kompetitívnej adsorpcie medzi molekulami detergentu v roztoku a molekulami RNA na povrchu elektródy. Nasledujúce experimenty sú založené na predpoklade, že počas ustanovenia rovnováhy dochádza len ku selektívnej desorpcii cGMP, kedy oligonukleotidy ostávajú naadsorbované na povrchu elektródy.

4.2.1. Premývanie v Tritone x-100

Ako vidieť na obrázku 4.2 pri prepláchnutí 1% roztokom Tritonu x-100, bola pozorovaná skoro úplná desorpcia cGMP z povrchu elektródy (svetlo zelená plná čiara vs. fialová čiarkovaná). Na obrázku bol viditeľný viacnásobný oxidačný pík cGMP, ktorý bol pravdepodobne spôsobený oligomerizáciou naadsorbovaného cGMP vplyvom vloženého kladného potenciálu na elektródu počas merania (svetlo zelená krivka). Predstaviteľ dlhších oligonukleotidov rG₉ po prepláchnutí v detergente Tritonu x-100 (oranžová čiara vs. čierna čiarkovaná) ostal z väčšej časti naadsorbovaný, kedy dochádzalo k stratám asi $\frac{1}{3}$ píku. V zmesi oligonukleotidov a cGMP dochádza ku kompetitívnej adsorpcii na povrchu PGE, čo mohlo viesť ku zmenám na výškach oxidačných píkov. Zmes rG₉ a cGMP aj po premytí vykazuje oxidačný signál, za ktorý je zodpovedný pravdepodobne naadsorbovaný oligonukleotid (tmavo fialová čiara vs. bordová). Oligo rG₄, ako predstaviteľ kratších molekúl RNA, po premytí ostáva naadsorbovaný na povrchu elektródy, čo dokazuje prítomnosť G^{ox}. Dochádza ku väčším stratám, rG₄ sa čiastočne desorbuje. Pri vzorke zmesi rG₄ a cGMP po premytí je prezenčný pík, za ktorý zodpovedá oxidácia guanínov v oligonukleotide.

Nukleové kyseliny a ich komponenty sa na povrch PGE adsorbujú ako pomocou bází, tak pomocou cukor-fosfátovej kostry. Zistili sme, že sila adsorpcie závisí na dĺžke reťazca. Sila adsorpcie má vplyv aj na straty vzniknuté desorpciou oligonukleotidov, kedy rG₄ sa desorbuje ľahšie, ako rG₉. Sila adsorpcie cGMP nie je dostatočne silná, aby vydržala



Obrázek 4.2: Voltamogram ukazujúci úbytok oligonukleotidov a cGMP po premytí detergentom Tritonu (plné čiary reprezentujú vzorku len rýchlo omyté v destilovanej vode, čiarkované vzorky reprezentujú meranie po zaradenom kroku 60 s desorpcie). V ľavom hornom rohu zobrazená molekula Tritonu x-100.

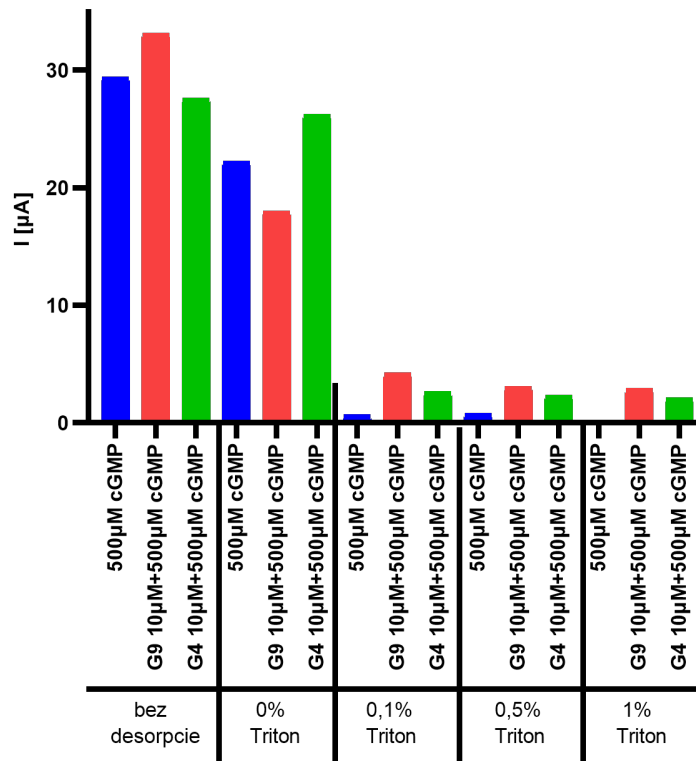
premytie povrchu elektródy detergentom Triton x-100 a preto dochádza skoro k celkovej desorpcii mononukleotidu.

Použitý detergent Triton x-100 vykazoval elektrochemický signál pri 1,5 V, ktorý ostáva aj po následnom premytí elektródy v destilovanej vode. V tejto oblasti dochádza ku oxidácii adenínu [77]. Pri voltametrickom meraní oligonukleotidov obsahujúcich adenín, by mohlo dochádzať k interferencii týchto oxidačných pík.

Zníženie koncentrácie Tritonu x-100

Cieľom je celkovo vymyť cGMP a znížiť straty vymývania oligonukleotidov. Snížením koncentrácie detergentu je jedna z možností, ako tohto cieľa dosiahnuť.

Na grafe 4.3 bolo porovnávané vymývanie cGMP a zmesí oligonukleotidov s cGMP v rôznych koncentráciách detergentu vrátane premývania v destilovanej vode (0% Triton x-100) počas jednej minúty. V destilovanej vode dochádza k čiastočnej desorpcii cGMP. Desorpcia cGMP 0,1% a 0,5% nie je úplná, ostávajú malé zvyšky na elektróde, čo znepresňuje merania zmesí s oligonukleotidmi. Oxidačné píky zmesí majú porovnateľné intenzity. Oxidačný pík oligonukleotidov bol najvyšší v prípade zmesí oligo rG₉ s cGMP, ktoré boli premývané v 0,1% Tritone. Toto mohlo byť spôsobené aj nedokonalým odstránením cGMP z elektródy, ktorý navyšuje tento signál, alebo vyššia hodnota maxima prúdu je v

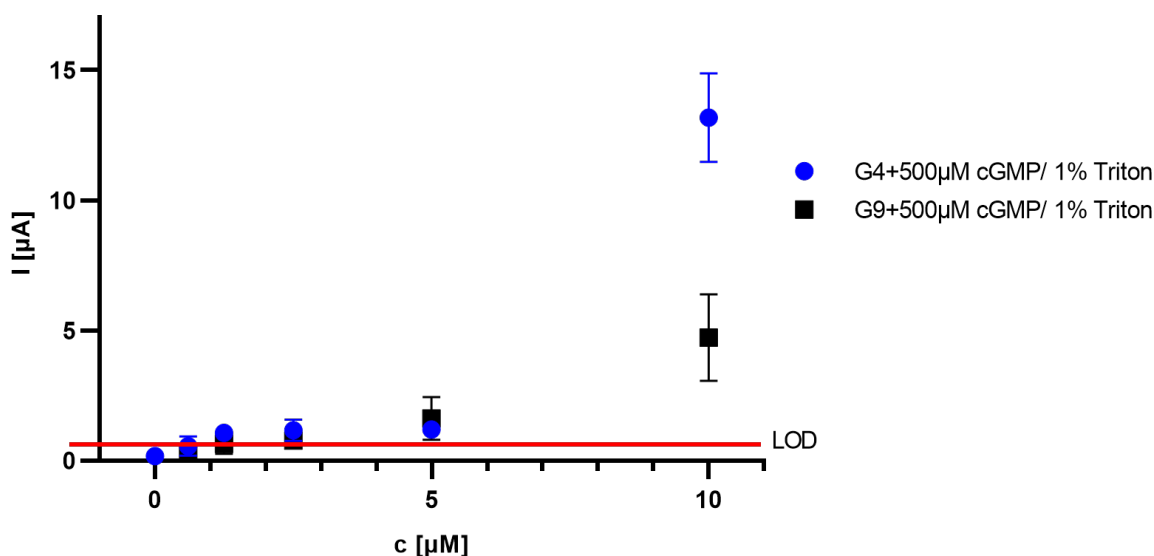


Obrázek 4.3: Maximálna pík G^{ox} po desorpcii v rôznych koncentráciách detergentu Triton x-100.

rámci odchylky merania. U rG₄ dochádza ku väčším stratám ako v prípade rG₉, z dôvodu nižšej adsorpčnej sily kratších oligonukleotidov.

Limit detekcie oligonukleotidov premývaním Tritonom x-100

Podľa grafu 4.3 je najvhodnejší 1% roztok Tritonu x-100, kedy dochádza k úplnej desorpcii cGMP. Preto bol 1% Triton x-100 vybraný pre zistenie najnižšej možnej koncentrácie oligonukleotidu, ktorá sa dá analyzovať v nadbytku cGMP. Na grafe 4.4 je vidieť závislosť výšky G^{ox} pík na indikovaných koncentráciách oligonukleotidov v zmesi s 500µM cGMP po premytí 1% Tritonom x-100. Ako vidieť hodnota maxima pík G^{ox} po premytí prudko klesá už pri koncentrácii 5µM rG₄ a rG₉, kedy táto hodnota je rovnaká pre oba oligonukleotidy. Tieto hodnoty môžu ovplyvňovať dva faktory - (1) kratšie molekuly difundujú rýchlejšie a môžu sa prednostne adsorbovať na povrch elektródy. V prípade kompetície oligonukleotidu rG₄ s cGMP, sa naadsorbuje viac oligonukleotidov na povrch PGE, ako v prípade kompetície rG₉ s cGMP. (2) desorpcia prebieha najskôr od najkratších reťazcov. Limit detekcie (LOD), bol zostrojený ako trojnásobok hodnoty smerodatnej odchylky pripočítanej ku píku oxidácie cGMP po desorpcii. Je to minimálna hodnota oxidačného signálu oligonukleotidu o ktorej môžeme prehlásiť, že sa jedná o signál oligonukleotidu s pravdepodobnosťou vyššou, ako 3σ. Pre oligonukleotidy rG₄ a rG₉ v zmesi s 500µM cGMP bola experimentálne zistená hodnota LOD 1,25µM. Priebeh krivky dokazuje, že po premytí PGE Tritonom x-100 ostáva naadsorbované len malé množstvo oligonukleotidov. Zvlášť pri nižších koncentráciách oligonukleotidov dochádza k ich veľkým stratám.



Obrázek 4.4: Premývanie rôznych koncentrácií oligonukleotidov rG₄ (modrá bodka) a rG₉ (čierny štvorec) v roztoku 500 μM cGMP 1% Tritonom x-100 s ukázaným limitom detekcie (LOD-naznačená červená priamka)(n=3).

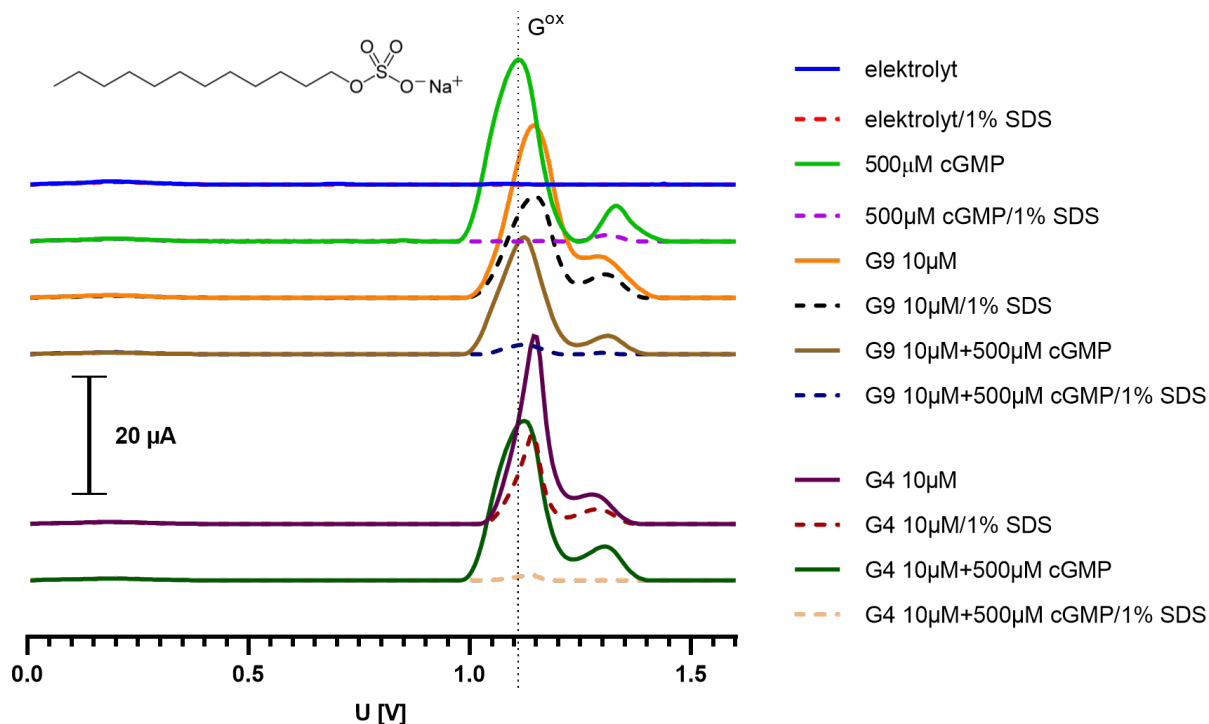
Intenzita signálu závisí aj na povrchu elektródy. Pred každou sériou meraní sa vrchné vrstvy elektródy odstraňujú, čím sa mení jej povrch, preto porovnávanie veľkosti píkov nie je presné a dochádza k odchýlkám v meraní.

1% roztok Tritonu x-100 desorbuje cGMP úplne z povrchu elektródy. U malých koncentráciách oligonukleotidu dochádza ku veľkým stratám, čo znemožňuje presnú analýzu oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku v nadbytku cGMP. Z tohto dôvodu koncentračná závislosť nemá lineárny priebeh a preto premývanie povrchu elektródy Tritonom x-100 nie je vhodné pre stanovenie obsahu nízkych koncentrácií RNA vzniklých pri neenzymatickej polymerizácii 3', 5' -cGMP.

4.2.2. Premývanie v SDS

Ako ďalší detergent pre selektívnu desorpciu cGMP z povrchu elektródy sme zvolili dodecylsírán sodný (SDS). SDS je iontová povrchovo aktívna látka obsahujúca sulfátovú skupinu, ktorá vykazuje silnú hydrofilitu. Pri ustanovení rovnováhy kompetitívnej adsorpcie dochádza ku trom typom interakcie. Prvá z nich je interakcia medzi povrchom elektródy a SDS, druhá oligonukleotidy s povrchom elektródy a tretia interakcia medzi SDS a oligonukleotidmi (poprípade cGMP). Posledná interakcia vzhľadom silnej hydrofilnej sulfátovej skupine môže silno ovplyvňovať desorpciu nielen cGMP, ale aj oligonukleotidov.

Narozdiel od Tritonu x-100, SDS nevykazuje v meranom rozsahu potenciálov žiaden elektrochemický signál, ktorý by interferoval so vzorkami oligonukleotidov a cGMP. Ako vidieť na obrázku 4.5 cGMP sa úplne desorboval po použití 1% roztoku detergentu SDS po dobu jednej minúty, čo ukazuje neprítomnosť G^{ox} píku (svetlo zelená krivka vs. fialová čiarkovaná). G^{ox} po premytí oligonukleotidu rG₉ klesol približne na polovicu pôvodnej hodnoty (oranžová krivka vs. čierna čiarkovaná). Desorpcia oligonukleotidov z povrchu elektródy použitým SDS, vidieť aj na zmesných vzorkách, kedy G^{ox} pík klesol skoro až na



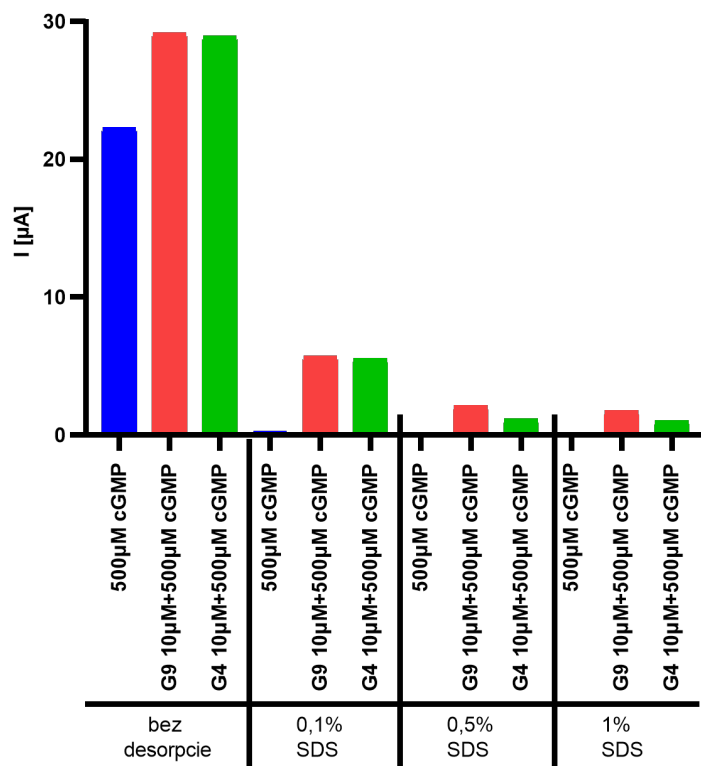
Obrázek 4.5: Voltamogramy po base-line korekcii ukazujúce úbytok oligonukleotidov a cGMP po premyvaní 1 minúty v detergente SDS (plné čiary reprezentujú vzorku len rýchlo omytú v destilovanej vode, čiarkované vzorky reprezentujú meranie po zaradenom kroku 60 s desorpcie). V ľavom hornom rohu zobrazená molekula SDS.

signál pozadia (tmavo zelená krivka vs. žltá čiarkovaná). Po premytí povrchu elektródy pík vzorky čistého oligonukleotidu rG₉ (poprípade rG₄) má vyššiu hodnotu ako vzorka oligonukleotidu v zmesi s 500 μM cGMP rovnako po premývaní elektródy v SDS. Pri kompetitívnej adsorpcii dochádza ku zaplneniu povrchu elektródy molekulami cGMP, čo po jeho selektívnom odstránení znižuje pík G^{ox} poskytovaného zostalými oligonukleotidmi. Výška píku G^{ox} poskytovaného vzorkou rG₄ po premytí v SDS taktiež klesol pod polovicu svojej pôvodnej hodnoty. Zmes rG₄ v roztoku 500 μM cGMP bola skoro úplne vymytá z povrchu elektródy.

Zníženie koncentrácie SDS

Rovnako, ako pri experimentoch s Tritonom x-100, jednou z možností ako zmenšiť straty po premývaní oligonukleotidov je zníženie koncentrácie detergentu SDS na hodnotu, u ktorej dochádza ešte k úplnej desorpcii cGMP.

Podľa veľkosti píkov G^{ox} v závislosti na rôznych koncentráciách premývania vzoriek v SDS na grafe 4.6, je možné vidieť že 0,5% SDS má podobný vplyv na desorpciu cGMP a zmesných vzoriek ako 1% roztok SDS. V týchto prípadoch dochádza k celkovému vymytiu cGMP, ale taktiež ku veľkým stratám odstraňovaním oligonukleotidov z povrchu elektródy. Pri premývaní 0,1% SDS nedochádza k celkovému vymytiu cGMP, kedy signál stúpol narozdiel od 1% SDS až o jeden rád. U oligonukleotidov nedochádza k tak veľkým



Obrázek 4.6: Výšky píku G^{ox} poskytované oligonukleotidmi a cGMP po desorpcii v rôznych koncentráciách roztoku detergentu SDS.

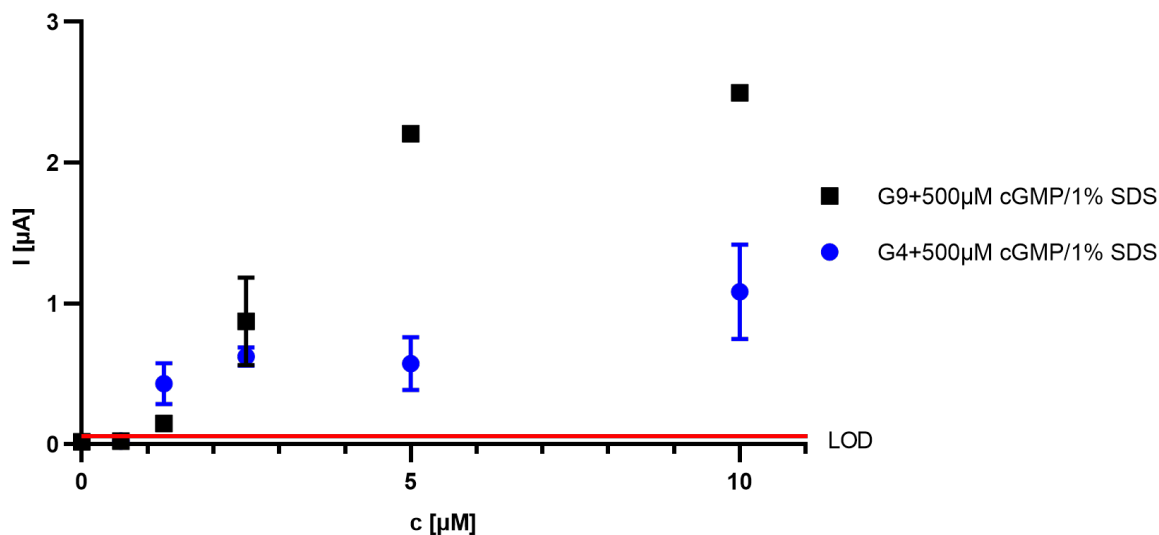
stratám, kedy ostávajú z väčšej časti naadsorbované. Nedokonalá selektívna desorpcia cGMP pravdepodobne prispieva k celkovej výške G^{ox} píku, ale príspevok je minimálny.

Zmesi vzoriek oligonukleotidov v roztoku SDS sú z veľkej časti vymývané a dochádza ku veľkým stratám aj pri dlhších oligonukleotidoch, ktoré majú väčšiu silu adsorpcie a afinitu k povrchu elektródy. Pri použití aj menej koncentrovaných roztokov SDS dochádza ku stratám aj oligonukleotidov. Znižovanie koncentrácie SDS vedie ku zvyšovaniu nešpecifického signálu cGMP.

Limit detekcie oligonukleotidov premývaním SDS

Limit detekcie bol pre lepšie porovnanie s ostatnými detergentami spravený 1% SDS. Ako bolo ukázané v predchádzajúcich grafoch, vymývaním oligonukleotidov v SDS dochádza k veľkým stratám na signále. Na druhej strane podľa grafu 4.7 vidieť, že cGMP sa úplne desorbuje z povrchu elektródy, kedy jeho signál je rovný signálu pozadia – elektrolytu. Nízke hodnoty prúdov na grafe 4.7 dokazujú veľké straty oligonukleotidov. Absencia nešpecifického signálu, ale umožňuje pomerne presnú analýzu oligonukleotidov v zmesi s cGMP (LOD bol aj v tomto prípade vypočítaný ako trojnásobok signálu pozadia). Pri oligo rG₉ v roztoku cGMP vidieť lineárny nárast píku G^{ox} v závislosti so vzrastajúcou koncentráciou oligonukleotidu, kedy najmenšia koncentrácia nad LOD je 1,25µM. Oligo rG₄ v roztoku cGMP má nižšie hodnoty signálov, kedy pri premývaní dochádzalo ku väčším stratám. Signál vymývaného rG₄ v 1% SDS sa všetky pohybovali okolo jednej hodnoty prúdu, kedy najvyšší prúd vykazovala vzorka 10µM rG₄ v 500µM cGMP. Tieto straty

spôsobené desorpciou 1% SDS znepresňujú analýzu a kvantifikáciu kratších oligonukleotidov nachádzajúcich sa v zmesi s cGMP. Rovnako najmenšia detekovateľná koncentrácie pre rG₄ v roztoku cGMP je 1,25 μM. Koncentrácia 0,6 μM bola pod stanoveným limitom detekcie.



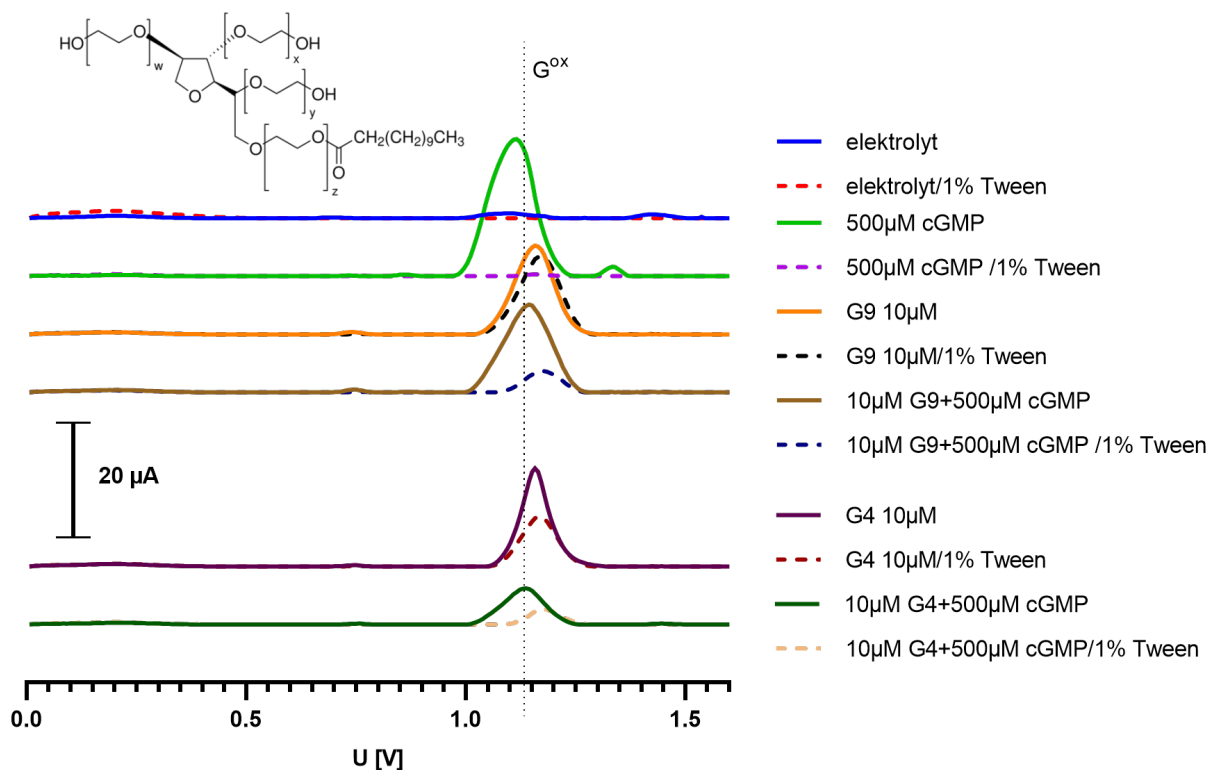
Obrázek 4.7: Premývanie rôznych koncentrácií oligonukleotidov rG₄(modrá bodka) a rG₉(čierny štvorec) v roztoku 500 μM cGMP 1% SDS s ukázaným limitom detekcie (LOD-naznačená červená priamka)(n=3).

Pre elektrochemickú analýzu vzoriek obsahujúcich polymerizačné produkty cGMP sa zdá byť vhodná metóda premývaním naadsorbovaného vzorku na povrchu PGE 1% SDS. SDS spoľahlivo odstraňuje z povrchu elektródy interferujúcu látku cGMP.

4.2.3. Premývanie v Tweene 20

Posledný testovaný detergent pre desorpciu cGMP bol použitý Tween 20. Tween 20 je polysorbátový typ nenabitého surfaktantu, ktorý obsahuje 20 opakujúcich jednotiek polyethylenglykolovej jednotky, čo má spoločné so štruktúrou Tritonu x-100, ale má kratšiu hydrofilnú časť, čo môže snižovať interakciu oligonukleotid (prípadne cGMP)/detergent a snižiť desorpciu oligonukleotidov. Tween 20 a SDS oproti Tritonu x-100 neobsahovali aromatickú časť, ktorá mohla byť dôvodom adsorbencie Tritonu x-100 na povrch elektródy, kedy poskytoval v oblasti 1,5 V oxidačný pík.

Ako vidieť na obrázku 4.8 tak Tween 20 nemá oxidačný signál v meranom rozsahu od 0 po 1,6 V. Pri použití 1% roztoku detergentu po dobu jednej minúty, bolo pozorované skoro úplné vymytie cGMP z povrchu elektródy. Oligonukleotidy rG₉ ostali naadsorbované a vykazovali rovnaký pík ako v prípade nepremývaného povrchu elektródy. Zmes po premytí mala menší signál v oblasti G^{ox}, ako v prípade samotného oligonukleotidu. Pri kompetitívnej adsorpcii zmesných vzoriek cGMP zaberie určitú časť povrchu, kedy po selektívnej desorpcii cGMP ostane menší oxidačný signál v porovnaní so vzorkou samotného oligonukleotidu. Oligo rG₄ zostali z väčšej časti naadsorbované, kedy ale straty neboli zanedbateľné. Zmes oligonukleotidu rG₄ spolu s 500 μM cGMP po premytí Twee-

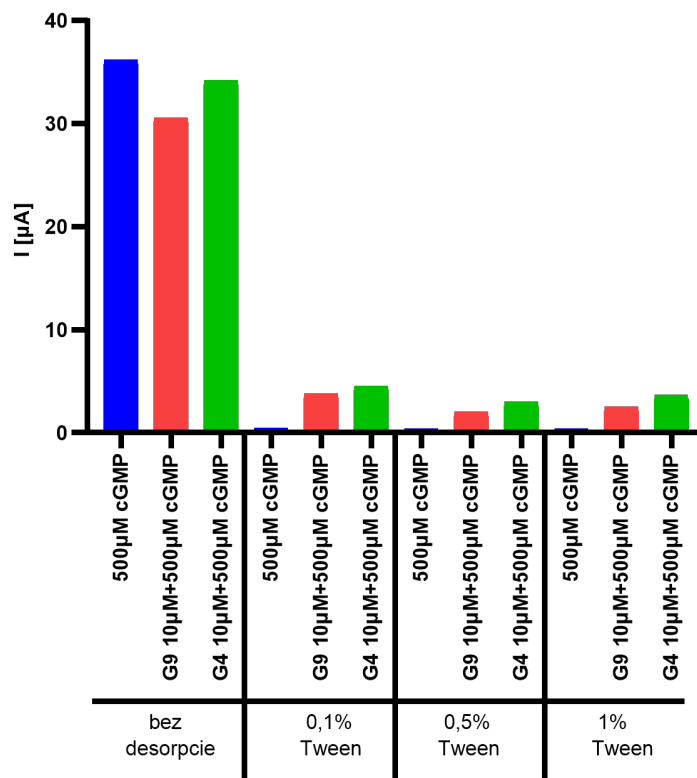


Obrázek 4.8: Voltamogramy ukazujúce úbytok oligonukleotidov a cGMP po premyvaní 1 minúty v detergente Tween 20 (plné čiary reprezentujú vzorku len rýchlo omytú v destilovanej vode, čiarkované vzorky reprezentujú meranie po zaradenom kroku 60 s desorpcie). V ľavom hornom rohu zobrazená molekula Tweenu 20.

nom 20 vykazovali pomerne veľký signál, kedy rozdiel pík bol pravdepodobne spôsobený odstránením cGMP z povrchu elektródy.

Zníženie koncentrácie Tweenu 20

Dlhšie oligonukleotidy majú silu adsorpcie dostatočne silnú, aby vydržali premývanie v Tweene 20. U kratších oligo rG₄ dochádza ku stratám približne 30% veľkosti píku. Podobne ako s ostatnými detergentami, znížením koncentrácie detergentu Tweenu 20 môže minimalizovať straty oligonukleotidov pri premývaní, kedy sa cGMP stále dostatočne desorbuje z povrchu elektródy. Na obrázku 4.9 vidieť, že 0,1%, 0,5% a 1% Tween 20 odstraňujú cGMP z povrchu elektródy s podobnou účinnosťou. Desorpcia cGMP 1% Tweenom 20 je najúčinnnejšia, kedy oxidačný pík má najnižšie hodnoty. Oligonukleotidy v zmesi sú najmenej odstraňované z povrchu elektródy 0,1% Tweenom. Príspevok nedesorbovaného cGMP je zanedbateľný pri porovnaní celkovej veľkosti píkov. Premývanie v nižších koncentráciách detergentu nemá zásadný vplyv na odstraňovanie cGMP a oligonukleotidov, kedy sa hodnoty premývania naadsorbovaného cGMP a zmesných vzoriek 0,1%, 0,5% a 1% Tweenom zásadne nelíšia. Pri nižších koncentráciách detergentu sa menej vymýva cGMP a dochádza naopak ku menšej desorpcii oligonukleotidov. Tieto rozdiely sú zanedbateľné.

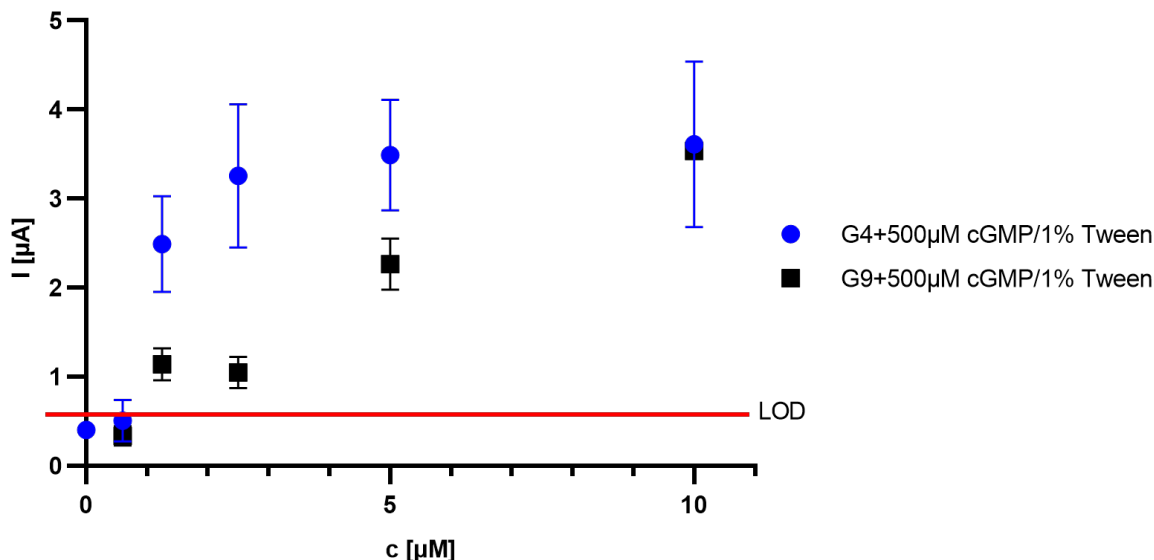


Obrázek 4.9: Výšky píkox G^{ox} poskytované cGMP a rG₄ a rG₉ oligonukleotidom po premytí v rôznych koncentráciách roztoku detergentu Tween 20.

Limit detekcie oligonukleotidov premývaním v Tweene 20

Pre lepšie porovnanie s ostatnými detergentami a vzhľadom k zanedbateľným rozdielom desorpcie cGMP a oligonukleotidov v závislosti na koncentrácii Tweenu 20 (diskutovaným v predchádzajúcom odstavci) bol vybraný 1% Tween 20. Na obrázku 4.10 je úroveň LOD naznačená priamkou, ktorá bola zostrojená ako trojnásobok hodnoty smerodajnej odchylky desorbovaného cGMP, pripočítaná ku priemernej hodnote odstraňovaného cGMP 1% Tweenom ($n=3$).

Najnižšia experimentálne zistená koncentrácia pre oba oligonukleotidy v zmesi s 500 µM cGMP, ktorá sa nachádza nad stanoveným LOD je 1,25 µM. Koncentrácia 0,6 µM oligo rG₄ a rG₉ v 500 µM cGMP sa už nachádza na úrovni signálu desorbovaného cGMP. Pri použití Tweenu 20 je smernica krivky koncentračnej závislosti strmšia ako v prípade premývania elektródy v Tritone x-100 (obrázok 4.4) a v SDS (obrázok 4.7). Nedochádza ku veľkým stratám na veľkosti píku oligonukleotidov v nižších koncentráciách. Pri rovnakých koncentráciách oligonukleotidov, rG₄ má vyššie hodnoty signálu oxidácie G ako v prípade rG₉. Smerodajné odchýlky rG₄ sú taktiež väčšie. To môže byť spôsobené priebehom adsorpcie, kedy kratšie molekuly môžu rýchlejšie difundovať k povrchu elektródy a v kompetícii o povrch elektródy s cGMP ju pokrývajú účejšie, ako dlhšie molekuly rG₉. Rýchlejšia kinetika adsorpcie molekúl na povrch elektródy môže byť rovnako príčinou väčšej smerodatnej odchylky u rG₄ v porovnaní s rG₉. Smerodatná odchylka taktiež narastá s celkovou veľkosťou píkox - preto je viac patrná v experimente s Tweenom 20 ako v prípade ostatných detergentov.



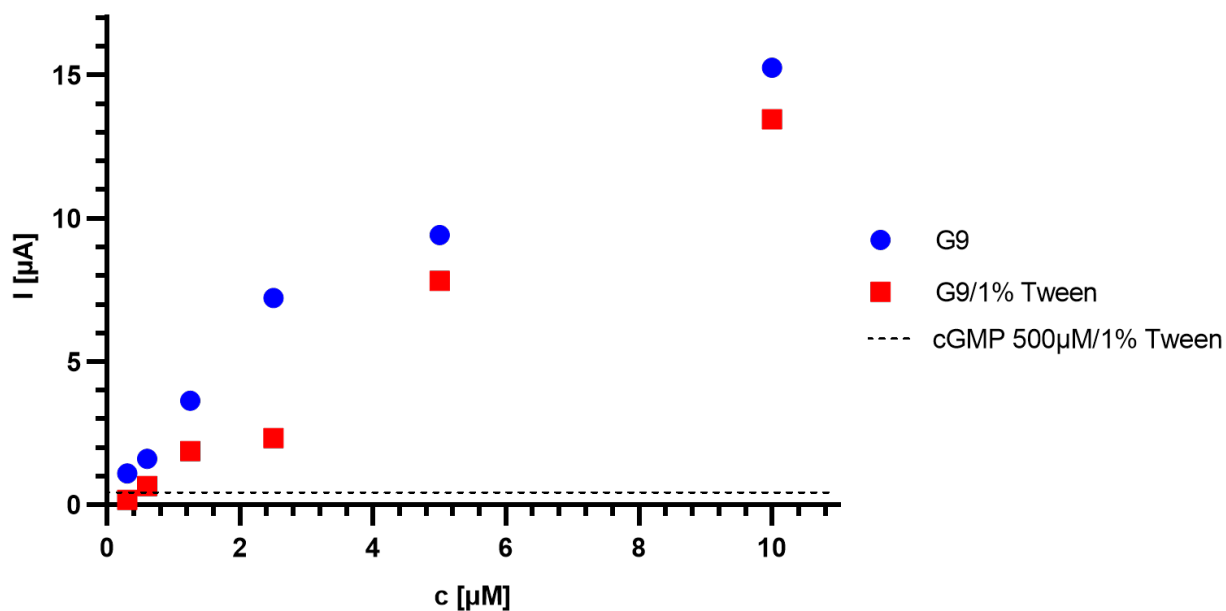
Obrázek 4.10: Desorpcia rôznych koncentrácií oligonukleotidov rG₄ (modrá bodka) a rG₉ (čierny štvorec) nachádzajúcich sa v zmesi s 500 μM cGMP 1% Tweenom. Hladina LOD naznačená červenou priamkou) ($n=3$).

Tween 20 je vhodnejší na selektívnu desorpciu cGMP z povrchu elektródy ako Triton x-100. Vďaka strmšej smernici kalibračnej krivky závislosti na koncentrácii je možné kvantifikovať oligonukleotidy pri nižších koncentráciách s väčšou presnosťou. To znamená, že pri použití Tweenu 20 pre selektívnu desorpciu cGMP nedochádza k veľkým stratám oligonukleotidov oproti Tritonu x-100. Z testovaných detergentov je Tween 20 je vhodnejší na analýzu vzoriek obsahujúcich produkty neenzymatickej polymerizácie 3', 5' -cGMP.

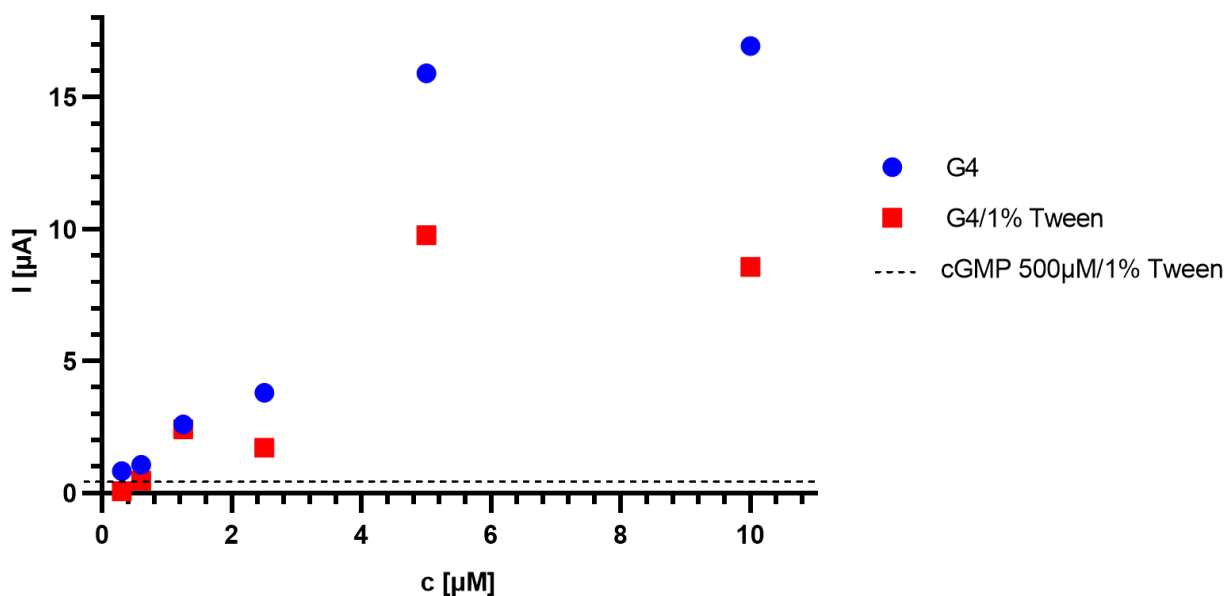
Odstraňovanie oligonukleotidov rG₄ a rG₉

Pri použití 1% roztoku detergentu tween 20 po dobu 1 minúty, je pozorovaná skoro úplná desorpcia cGMP z povrchu elektródy, zatiaľ čo oligonukleotidy pri koncentrácií 10 μM rG₉ a rG₄ ostali z väčšej časti naadsorbované (obrázok 4.8). Z tohto dôvodu bola prevedená analýza koncentračnej rady oligonukleotidov bez cGMP, pre lepšie zobrazenie nežiadúcej desorpcie oligonukleotidov pri premývaní povrchu elektródy 1% Tweenom.

Na obrázku 4.11 sú ukázané straty oligonukleotidu rG₉ pri rôznych koncentraciách spôsobených vymývaním povrchu elektródy PGE v 1% Tweene 20. Je vidieť lineárny nárast prúdu so zvyšujúcou koncentráciou odstraňovaného a neodstraňovaného oligonukleotidu rG₉. Pri vyšších koncentráciách je strata oligonukleotidu rG₉ zanedbateľná. Od koncentrácie 2,5 μM sa desorbuje približne polovica oligonukleotidu z povrchu elektródy, ale nedochádza k úplnej desorpcii. Hodnota signálu pri koncentraciách 0,6 μM sa blíži hodnote prúdu cGMP vymývaného 1% Tweenom. Toto sa zhoduje so skôr popísaným zistením, že vzorky ktoré majú menšiu koncentráciu ako 1,25 μM v roztoku cGMP, nie sme schopní rozlíšiť od hodnoty nešpecifického píku cGMP po premytí elektródy v Tweene. Na obrázku 4.11 je aj ukázané, že zvolená elektrochemická analýza je schopná rozlíšiť už 0,3 μM koncentráciu oligonukleotidov rG₉ bez desorpčného kroku v 1% Tweene 20.



Obrázek 4.11: Premývanie rôznych koncentrácií oligonukleotidov rG₉ v destilovanej vode (modrá bodka) a rG₉ premývaných v detergente 1% Tweene (červený štvorec) s ukázanou priamkou predstavujúcu priemernú hodnotu desorbovaného 500μM cGMP v 1% Tweene.



Obrázek 4.12: Premývanie rôznych koncentrácií oligonukleotidov rG₄ v destilovanej vode (modrá bodka) a rG₄ premývaných v detergente 1% Tweene (červený štvorec) s ukázanou priamkou predstavujúcu hodnotu desorbovaného 500μM cGMP v 1% Tweene.

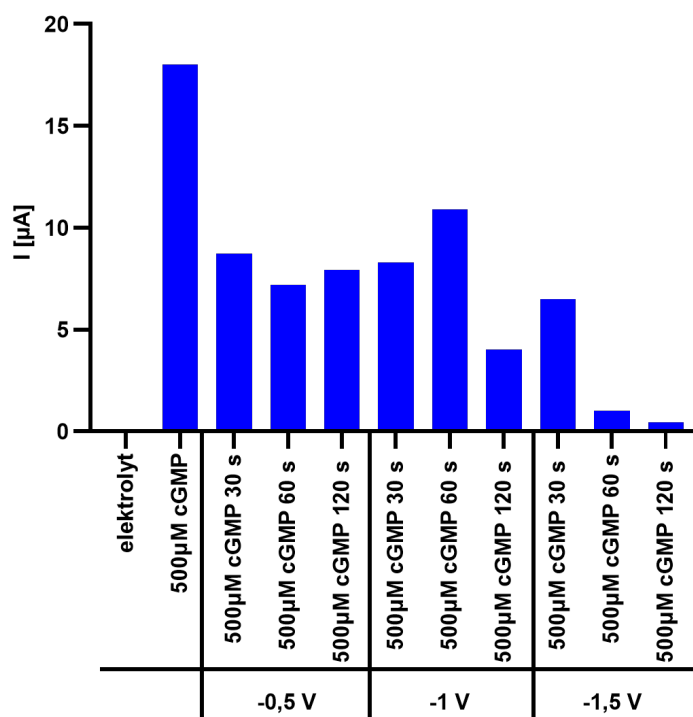
Na obrázku 4.12 je ukázaná desorpcia oligonukleotidu rG₄ zapríčinená vymývaním 1% Tweenom 20. Hodnoty prúdov lineárne narastajú v závislosti na zvyšujúcich sa koncent-

ráciou oligonukleotidov rG₄, ale ako už bolo diskutované vyššie, variabilita píkov poskytovaných oligonukleotidmi rG₄ bola vyššia. Straty kratších oligonukleotidov sú v porovnaní s rG₉ väčšie. Už pri koncentrácií 10 μM dochádza k poklesu signálu po vymývaní povrchu 1% Tweenom počas 1 min na polovicu. Rovnako hodnoty do 0,6 μM nie sú rozoznateľné od vzorky cGMP premývaného 1% Tweenom, kedy dochádza k prekryvu týchto bodov. Premývanie čistých oligonukleotidov sa opäť zhoduje s predchádzajúcim zistením, že táto technika nie je vhodná pre analýzu oligonukleotidov pod 1,25 μM koncentráciu, keďže získané výšky pík sa pri tejto koncentrácii blížia hodnotám nešpecifického signálu cGMP a teda LOD.

4.3. Odstraňovanie cGMP záporným potenciálom

4.3.1. Selektívne odstraňovanie cGMP pomocou záporného potenciálu

Okrem techniky založenej na selektívnej desorpcii cGMP pomocou detergentu, sme sa rozhodli vyskúšať desorbovať cGMP vložением záporného potenciálu na elektródu. Vyšli sme z predpokladu, že tento postup založený na elektrostatickom odpudzovaní, by mohol viesť ku selektívnej desorpcii cGMP z povrchu elektródy, ktorý sa na elektródu adsorbuje slabšie ako oligonukleotidy.



Obrázek 4.13: Vplyv vloženého záporného potenciálu $-0,5$ V, -1 V a $-1,5$ V na desorpciu $500 \mu\text{M}$ cGMP z povrchu elektródy v acetátovom pufré o pH 5 počas rôznych časov.

Na obrázku 4.13 je ukázané odstraňovanie $500 \mu\text{M}$ cGMP z povrchu záporne nabitej elektródy. Odpudzovanie bolo prevádzané v $0,2\text{M}$ acetátovom pufré o pH 5, v ktorom

prebehlo aj následné meranie. Boli vyskúšané rôzne vložené záporné potenciály na elektródu na ktorej bol naadsorbovaný cGMP počas 30, 60 a 120 sekúnd. Na obrázku 4.13 je ukázaný účinok vloženého záporného potenciálu na elektródu na desorpciu cGMP. Pri vložení $-0,5\text{ V}$ dochádza pre všetky časy k poklesu hodnoty signálu oxidácie na polovicu. Vkládanie záporného potenciálu $-0,5\text{ V}$ v rôznych dobách nemá väčší vplyv na odstraňovanie cGMP z povrchu elektródy, kedy sa signál pohybuje okolo jednej hodnoty prúdu. V prípade vloženia -1 V až pri 120 sekundách dochádza k väčšiemu poklesu signálu asi na jednu tretinu pôvodnej hodnoty. Desorpcia cGMP pre tieto dva potenciály nie je dostatočná pre analýzu oligonukleotidov v roztoku cGMP. Pri vložení záporného potenciálu $-1,5\text{ V}$ dochádza po 60 sekundách k výraznému poklesu, kedy oxidáčny signál je minimálny. V potenciále $-1,5\text{ V}$ dochádza ku redukcii guanínu na 7,8-dihydroguanín [91]. Redukciou guanínu dochádza k poklesu oxidačného signálu v oblasti $1,1\text{ V}$, kedy nedochádza ku odstraňovaniu cGMP z povrchu elektródy, ale len jeho elektrochemickej premene.

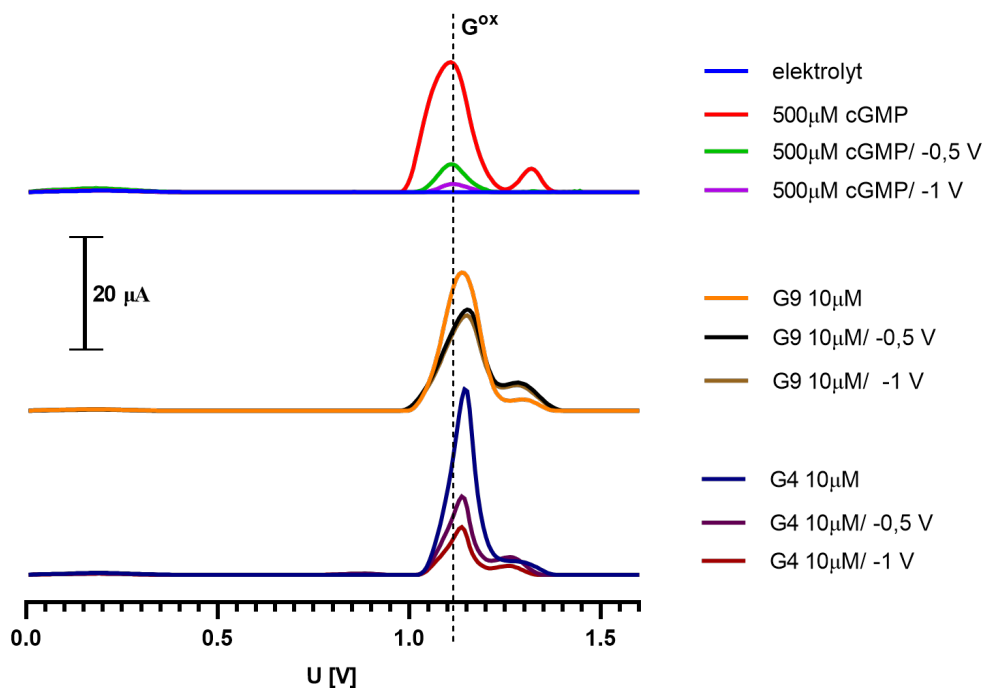
Selektívne odstraňovanie cGMP pomocou záporného potenciálu v bazickom prostredí

Jedna z možností selektívneho odstránenia cGMP z povrchu elektródy je pomocou vloženého záporného náboja na elektródu, ktorá je ponorená v bazickom médiu. V bazickom prostredí sa môžu negatívne nabíjať nukleové báze guanínu (pK_a 9,2) a OH skupina prítomná na ribóze [89]. Týmto sa zväčšuje celkový negatívny náboj molekuly, čím dochádza k silnejšiemu elektrostatickému odpudzovaniu s povrchom elektródy. Odpudzovanie v potenciáloch $-0,5\text{ V}$ a -1 V prebiehalo vo fosfátovom pufré o pH 12 počas jednej minúty, kedy sa očistená elektróda premiestnila do acetátového pufru o pH 5, kde prebehlo samotné meranie. Potenciál $-1,5\text{ V}$ už nebol ďalej skúšaný, keďže dochádzalo k iným elektrochemickým javom ako desorpcii cGMP.

Na obrázku 4.14 je vidieť vplyv odpudzovania v bazickom prostredí medzi cGMP alebo oligonukleotidmi a negatívne nabitej uhlíkovej elektróde pri vloženom potenciále $-0,5\text{ V}$ a -1 V . Signál oxidácie $500\mu\text{M}$ cGMP v pH 12 po vložení záporného potenciálu významne klesá, kedy väčšina cGMP je z povrchu elektródy desorbovaná. V alkalickom prostredí pri vložení dostatočných negatívnych potenciálov nie je adsorpčná sila cGMP na povrch elektródy dostatočne silná a dochádza ku jeho desorpcii. Použitie potenciálu -1 V je účejšie na odstránenie cGMP. Pri odpudzovaní oligonukleotidov rG₉ je patrný len malý rozdiel, kedy dochádza pri použití oboch záporných potenciálov ku rovnakým stratám. Oligonukleotidy rG₉ sú dostatočne silno naadsorbované, aby vydržali podmienky za ktorých dochádza k desorpcii cGMP elektrickým nábojom a výmenu média. Oligo rG₄ sú adsorbované slabšie a pri vloženom potenciále na elektródu odstraňovanie, klesla výška píku pod jednu polovicu. Vložený záporný potenciál -1 V má väčší vplyv na odstraňovanie oligonukleotidov rG₄.

Pre ďalšiu optimalizáciu techniky desorpcie cGMP vložením negatívneho potenciálu bola prevedená analýza koncentračnej rady oligonukleotidov rG₄ a rG₉ na zistenie LOD.

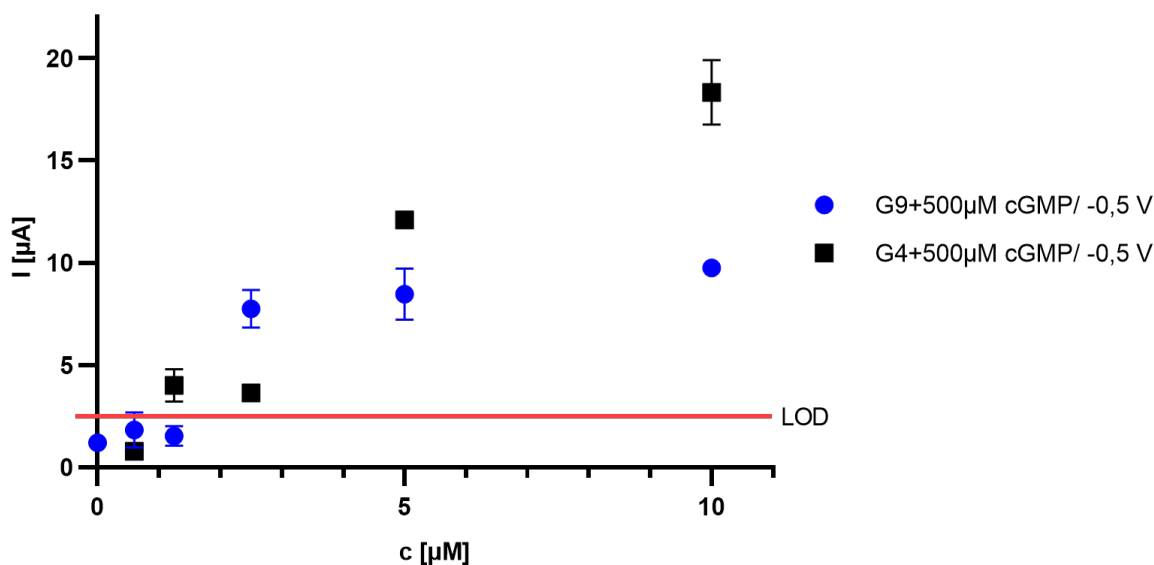
Na obrázku 4.15 vidieť hodnoty signálov rôznych koncentrácií zmesných vzoriek oligonukleotidov v roztoku $500\mu\text{M}$ cGMP pri vloženom zápornom potenciále $-0,5\text{ V}$ na elektródu. Z meraní zobrazených na obrázku 4.14 vyplývalo, že nedochádza ku veľkým stratám oligonukleotidov a cGMP nie je z elektródy odstránené úplne. Tento predpoklad aj dokazujú vysoké hodnoty prúdov oxidačných píkov guanínu. Experimentálne zistené



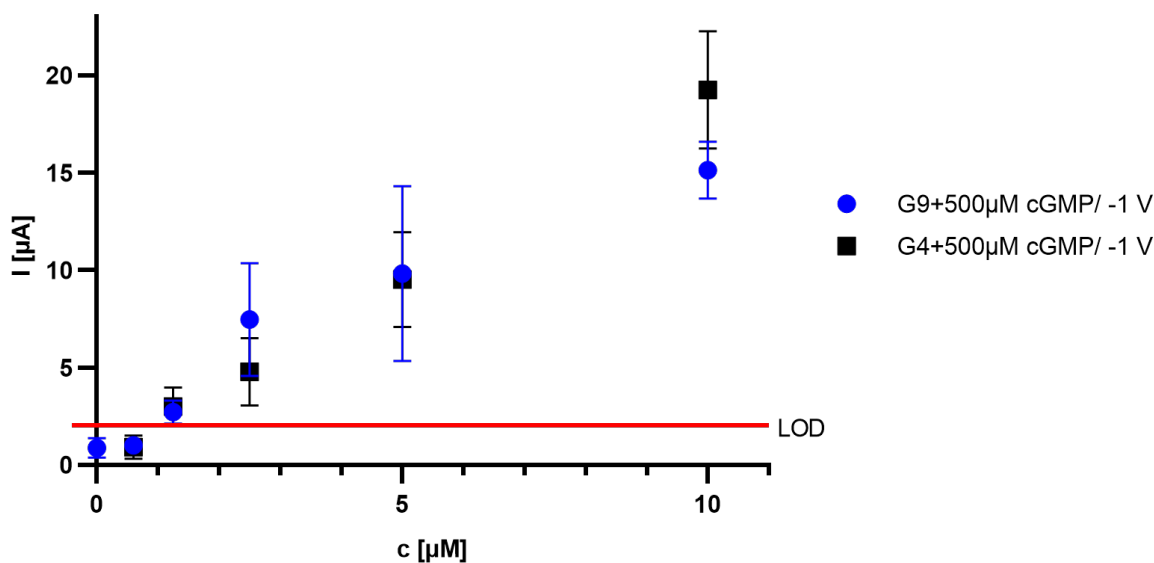
Obrázek 4.14: Odstraňovanie cGMP a oligonukleotidov záporným potenciálom $-0,5\text{ V}$ a -1 V vloženým na uhlíkovú elektródu v fosfátovom pufre o pH 12 počas jednej minúty. Na obrázku sú zobrazené Voltamogramy ukazujúce oxidačne signál G po baseline korekcii.

data ukazujú, že kratšie oligonukleotidy rG_4 v roztoku $500\mu\text{M}$ cGMP sú od $1,25\mu\text{M}$ koncentrácie nad hladinou LOD. Dlhšie oligonukleotidy rG_9 sú nad hladinou LOD od $2,5\mu\text{M}$ koncentrácie, kedy nižšie hodnoty sa nedajú rozlíšiť od pozadia nedosorbovaného cGMP. Toto poukazuje na zložité chovanie desorpcie pri vloženom zápornom potenciále adsorbovaných vzoriek oligonukleotidov v zmesi cGMP. Dochádza k väčšiemu odstraňovaniu dlhších oligonukleotidov rG_9 , čo môže byť zapríčinené väčším odpudzovaním od záporne nabitej elektródy, kedy dochádza ku ich desorpcii. Relatívne nízka účinnosť odstraňovania cGMP vloženým záporným potenciálom znepresňuje analýzy oligonukleotidov v porovnaní s použitím desorpcie prostredníctvom detergentov. Kratšie oligonukleotidy majú lineárny nárast prúdu so zmenou koncentrácie. Dlhšie oligonukleotidy nemajú nárast prúdu v závislosti na koncentracii až taký výrazný, kedy sa od $2,5\mu\text{M}$ pohybujú okolo jednej hodnoty výšky píku. Malé odchylky od lineárneho trendu mohli byť spôsobené aj chybou merania alebo nepresnou prípravou vzorkou.

Na druhom obrázku 4.16 je ukázané selektívne odstraňovanie cGMP z povrchu PGE zo zmesi vzoriek oligonukleotidov a $500\mu\text{M}$ cGMP pri vložení záporného potenciálu -1 V elektródu. Odstraňovanie cGMP pri vloženom napätí -1 V umožňuje analyzovať oligonukleotidy rG_4 aj rG_9 až do koncentrácie $1,25\mu\text{M}$. Tento potenciál -1 V je výhodnejší na analýzu nižších koncentrácií oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku $500\mu\text{M}$ cGMP. Smerodajné odchýlky v prípade -1 V boli oveľa väčšie, keďže pravdepodobne dochádza k rozličnému a zložitejšiemu chovaniu desorpcie pri vloženom napätí -1 V . Na obrázku 4.16 vidieť lineárny nárast hodnôt prúdu v závislosti so zvyšujúcou koncentraciou oligonukleotidov. To taktiež poukazuje, že za oxidačný signál zodpovedajú guaníny oligonukleotidov.



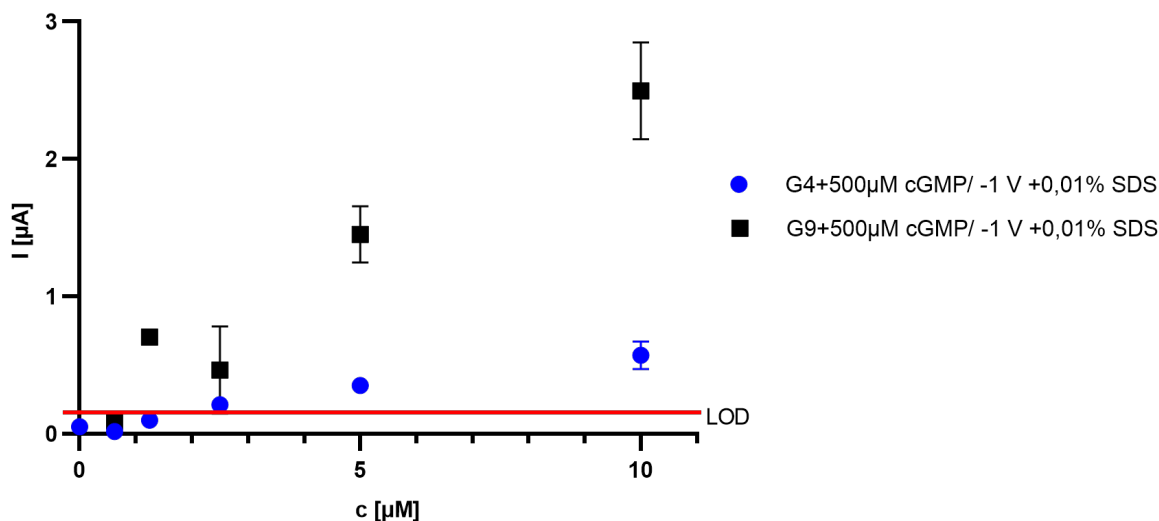
Obrázek 4.15: Desorpcia cGMP zo zmesných vzoriek rôznych koncentrácií oligonukleotidov rG₄ (modrá bodka) a rG₉ (čierny štvorec) nachádzajúcich sa v roztoku 500μM cGMP pomocou vloženého záporného potenciálu -0,5 V na PGE vo fosfátovom pufore o pH 12. Meranie následne prebiehalo v 0,2M acetátovom pufore o pH 5. Naznačený je limit detekcie (LOD-červená priamka)(n=3).



Obrázek 4.16: Desorpcia cGMP zo zmesných vzoriek rôznych koncentrácií oligonukleotidov rG₄ (modrá bodka) a rG₉ (čierny štvorec) nachádzajúcich sa v roztoku 500μM cGMP pomocou vloženého záporného potenciálu -1 V na PGE vo fosfátovom pufore o pH 12. Meranie následne prebiehalo v acetátovom pufore o pH 5. Naznačený je limit detekcie (LOD-červená priamka)(n=3).

Selektívna desorpcia cGMP pomocou záporného potenciálu a SDS v bazickom prostredí

Ako bolo ukázané na obrázku 4.15, cGMP sa pri vložení záporného potenciálu neodstraňuje úplne, čo znemožňuje elektrochemickú analýzu nízkych koncentrácií oligonukleotidov nachádzajúcich sa v $500\mu\text{M}$ cGMP. Odstraňovanie cGMP z povrchu elektródy prebiehalo najefektívnejšie pri použití detergentu SDS. Kombináciou vloženého záporného potenciálu na elektródu a premývania povrchu elektródy v detergente, môže byť ďalšou možnosťou selektívneho odstraňovania slabo adsorbujúcich molekúl cGMP z povrchu PGE.



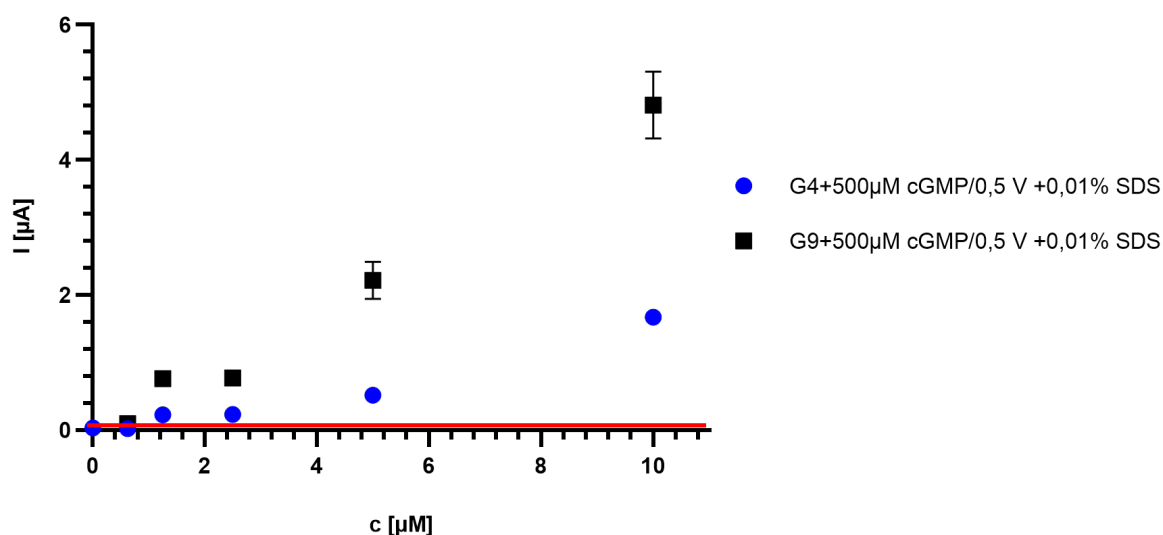
Obrázek 4.17: Selektívna desorpcia cGMP zo zmesných vzoriek rôznych koncentrácií oligonukleotidov rG_4 (modrá bodka) a rG_9 (čierny štvorec) nachádzajúcich sa v roztoku $500\mu\text{M}$ cGMP pomocou premývania záporne nabitej elektródy pri -1 V v $0,01\%$ SDS v bazickom prostredí pri pH 12. Meranie následne prebiehalo v acetátovom elektrolyte o pH 5. Naznačený je limit detekcie (LOD-červená priamka)($n=3$).

Pre analýzu oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku $500\mu\text{M}$ sa vybral ako najvhodnejší vložený záporný potenciál -1 V na elektródu a $0,01\%$ SDS, ktorý sa nachádzal v roztoku fosfátového pufru o pH 12, kedy dochádzalo k najväčšej desorpcii cGMP. Samotné meranie prebiehalo v $0,2\text{M}$ acetátovom pufré o pH 5. Vplyvom záporného potenciálu na elektródu dochádza ku odpudzovaniu nábojov a reorientácii naadsorbovaných molekúl cGMP a oligonukleotidov na povrch jej klesá, kedy už pri použití $0,01\%$ SDS dochádza k úplnému odstráneniu cGMP. Výška píku G^{ox} na obrázku 4.17 pre zmesné vzorky oligonukleotidov rG_4 a rG_9 nachádzajúcich sa v roztoku $500\mu\text{M}$ cGMP ukazuje, že oligonukleotidy ostávajú naadsorbované. Experimentálne zistené dáta ukazujú, že zvolený postup selektívneho odstraňovania cGMP pre analýzu oligonukleotidov je vhodná do koncentrácie $1,25\mu\text{M}$ pre rG_9 a $2,5\mu\text{M}$ pre kratšie oligo rG_4 , kedy sa hodnoty píkov nachádzajú nad hladinou LOD. Oligonukleotidy rG_4 sú viac desorbované z povrchu elektródy v porovnaní s dlhšími oligo rG_9 . Desorpciu detergentom dlhších oligonukleotidov rG_9 pravdepodobne neovplyvňuje vložený záporný potenciál tak silno, ako v prípade oligonukleotidov rG_4 , kedy už pri použití $0,01\%$ SDS dochádza ku veľkým stra-

tám. Hodnoty píkox oxidácie oligo rG₄ sa už v prípade 10 μM koncentrácie nachádzajú blízko hodnote LOD.

4.3.2. Selektívna desorpcia cGMP pomocou SDS v bazickom prostredí na kladne nabitom povrchu

Pri selektívnej desorpcii cGMP u zmesných vzoriek v detergente, dochádza ku veľkým stratám signálu oligonukleotidov. Sila adsorpcie nie je dostatočná, aby vydržali oligonukleotidy naadsorbované na povrchu uhlíkovej elektródy pri premývaní v roztoku detergentu. Vložením kladného potenciálu na elektródu v bazickom prostredí, dochádza k nielen hydrofóbnym interakciám s povrchom PGE a záporne nabitými molekulami cGMP a oligonukleotidmi, ale aj ku príťažlivej sile vďaka elektrostatickej interakcii medzi nábojmi. Vychádzame z predpokladu, že vložením kladného potenciálu na elektródu zvýšime silu adsorpcie, ktorá môže byť v prípade oligonukleotidov natoľko silná, že vydrží premytie elektródy v roztoku detergentu v bazickom prostredí a môže zvýšiť presnosť analýzy menej koncentrovaných oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku cGMP.



Obrázek 4.18: Selektívna desorpcia cGMP zo zmesných vzoriek rôznych koncentrácií oligonukleotidov rG₄ (modrá bodka) a rG₉ (čierny štvorec) nachádzajúcich sa v roztoku 500 μM cGMP pomocou premývania kladne nabitej elektródy pri 0,5 V v 0,01% SDS v bazickom prostredí pri pH 12. Meranie následne prebiehalo v acetátovom elektrolyte o pH 5. Naznačený je limit detekcie (LOD-červená priamka)(n=3).

Na obrázku 4.18 je ukázaný vplyv vloženého kladného potenciálu na premývaní elektródu roztokom 0,01% SDS vo fosfátovom pufré o pH 12 na selektívnu desorpciu cGMP zo vzorkou obsahujúcej oligonukleotidy v zmesi s 500 μM cGMP. Ako kladný potenciál sa zvolil 0,5 V, kedy ešte nedochádza ku oxidácii guanínu a je dostatočne veľký aby mohol ovplyvniť adsorpciu oligonukleotidov. Pre oligonukleotidy rG₄ a rG₉ v zmesi s 500 μM cGMP bola experimentálne zistená hodnota LOD. Samotné cGMP sa po premývaní elektródy 0,01% SDS úplne desorbujú. Podľa nameraných dát desorpciu cGMP z povrchu elektródy neovplyvňuje vložený kladný potenciál. Pre oligonukleotidy rG₉ experimentálne

zistená minimálna koncentrácia, ktorá sa nachádza nad hladinou LOD, je už $0,6\mu\text{M}$. Kratšie oligonukleotidy, sa dajú s presnosťou určiť od $1,25\mu\text{M}$, kedy táto hodnota koncentrácie sa nachádza nad hladinou LOD. Strmšia smernica priamky koncentračnej rady oligonukleotidu rG₉ poukazuje na vplyv vloženého kladného potenciálu na silu adsorpcie dlhších oligonukleotidov na povrch elektródy. Príťažlivá sila medzi nábojmi znižuje straty a desorpciu oligo rG₉. Efekt príťažlivej sily je menší v prípade kratších oligonukleotidov rG₄, čo poukazujú aj menšie hodnoty maximálnych pík G^{ox} a aj najnižšia možná koncentrácia nachádzajúca sa nad hladinou LOD. V porovnaní selektívnej desorpcii v čistom SDS (obrázok 4.7) hodnota píku G^{ox} pre $10\mu\text{M}$ rG₉ stúpla skoro dvojnásobne. Taktiež minimálna koncentrácia oligonukleotidov rG₉, ktorú sme schopní kvantifikovať je v prípade vloženého kladného potenciálu a použitia menej koncentrovaného roztoku SDS v bazickom prostredí menšia ($0,6\mu\text{M}$), ako v prípade desorpcie len 1% roztokom SDS ($1,25\mu\text{M}$).

Zvolený postup vloženého kladného potenciálu môže byť vhodný na zníženie strát oligonukleotidov pri premývaní elektródy 0,01% roztokom SDS. Kombinácia kladného potenciálu a selektívnej desorpcie cGMP pomocou detergentu SDS pri porovnaní s ostatnými postupmi a použitiami detergentu sa zdá byť najvhodnejšia pri analýze oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku $500\mu\text{M}$ cGMP vznikajúcich za podmienok modelujúcich prebiotické prostredie.

4.4. Analýza produktov spontánnej neenzymatickej polymerizácie 3',5' -cGMP

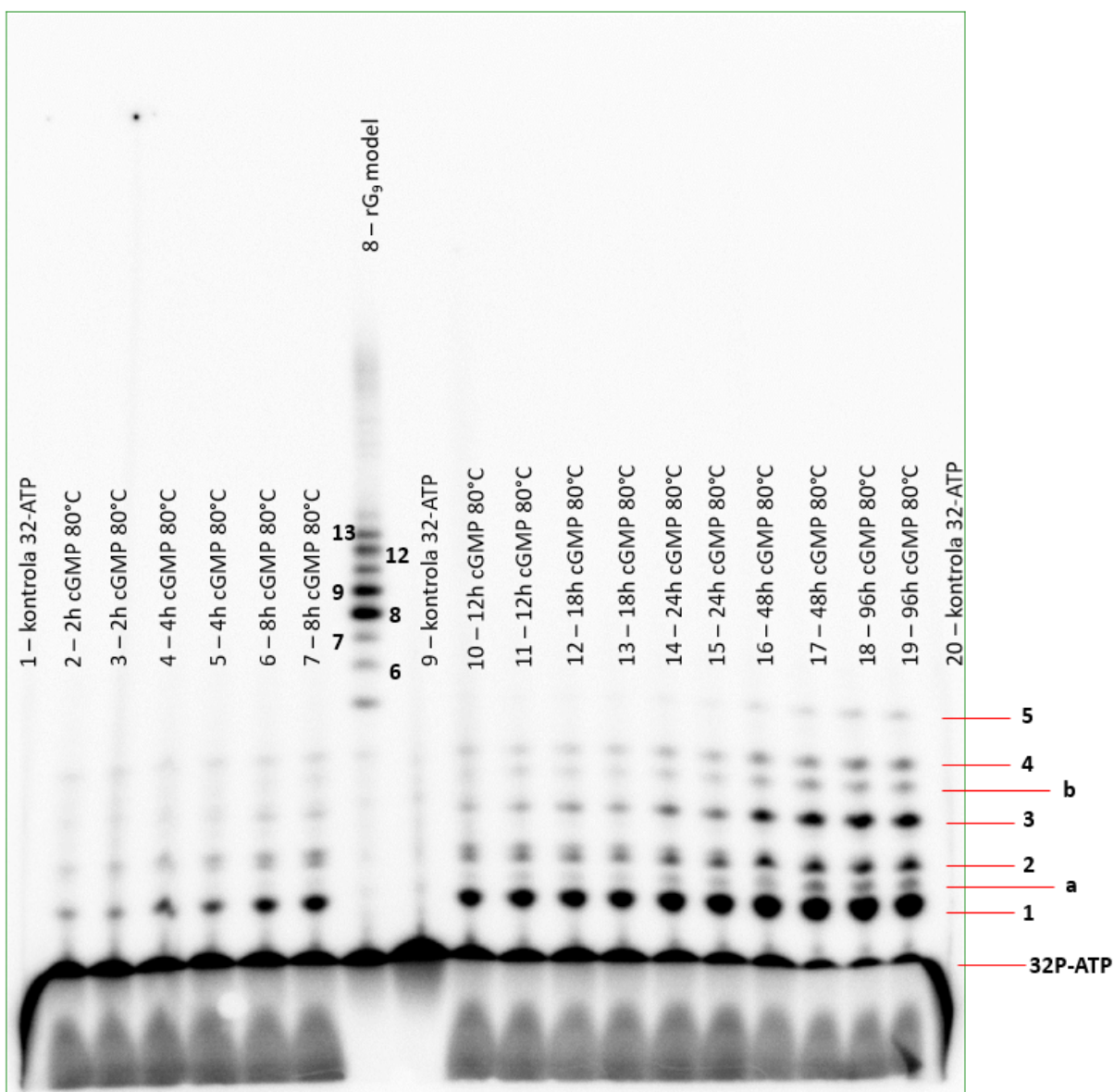
4.4.1. Príprava vzoriek

Neenzymatická polymerizácia prebiehala pri 80°C v suchom stave, 1mM vzorky $150\mu\text{l}$ 3',5'-cGMP boli najskôr vysušené vo vákuu a potom nasledovala neenzymatická polymerizácia pri 80°C v suchom stave po rôzne dlhú dobu - od 2 do 96 hodín. Výsledok tohto experimentu bol s neobvykle nízkym výťažkom (v porovnaní s predchádzajúcimi experimentami [2], pravdepodobne kvôli nedostatočnému vysušeniu vzoriek pred polymerizáciou. Pre následnú elektroforetickú analýzu boli vzorky rozpustené v miliQ vode, naznačené ^{32}P -ATP (Nastavenie elektroforézy je uvedené v časti 3.2.1.).

4.4.2. Analýza oligonukleotidov pomocou gélovej elektroforézy

Produkty polymerizácie 3',5'-cGMP za prebiotických podmienok sa charakterizujú hlavne denaturačnou PAGE. Analýza denaturačnou PAGE značených oligonukleotidov $5'$ ^{32}P je aspoň o jeden rád citlivejšia ako iné detekčné techniky (vrátane hmotnostnej spektrometrie) [2]. Denaturačné podmienky gélu zaručujú, že stackované štruktúry neovplyvňujú hodnotenie polymerizačných produktov.

Na obrázku 4.19 je ukázaná analýza PAGE preliminárnych vzoriek produktov polymerizácie cGMP. Šarty 1, 9 a 20 zodpovedajú za vzorku čistého ^{32}P -ATP, ktorý poskytuje len jeden band (pruh). Okrajové šarty 1 a 20 sú pokrivené vplyvom blízkosti krajov gélu. Štart 8 predstavuje vzorku čiastočne degradovaného modelového oligomeru rG₉, ktorá pravdepodobne obsahovala aj dlhšie produkty, vzniklé pri samotnej výrobe. Pre tieto vzorky predstavujúce polymerizačné produkty vidieť, že najdlhší vzniknutý oligonukleotid po 96 hodinách pri 80°C je o dĺžke 5 nukleotidov, kratší ako očakávané produkty



Obrázek 4.19: Denaturačná PAGE polymerizačných produktov 3',5'-cGMP. Na 20% polyakrylamidový gél sú vynesené aj kontrolné vzorky blanku čistého ^{32}P -ATP (štart 1,9 a 20) a kontrolná modelová vzorka $3\mu\text{M}$ oligonukleotidov rG_9 (štart 8). Ostatné štarty predstavujú vzorky produktov neenzymatickej polymerizácie cGMP, kedy syntéza prebiehala počas rôznych uvedených časov. Čísla bandov ukázané vpravo a okolo štartu 8, predstavujú počet jednotiek oligonukleotidu a bandy „a“ a „b“ predstavujú degradačné produkty.

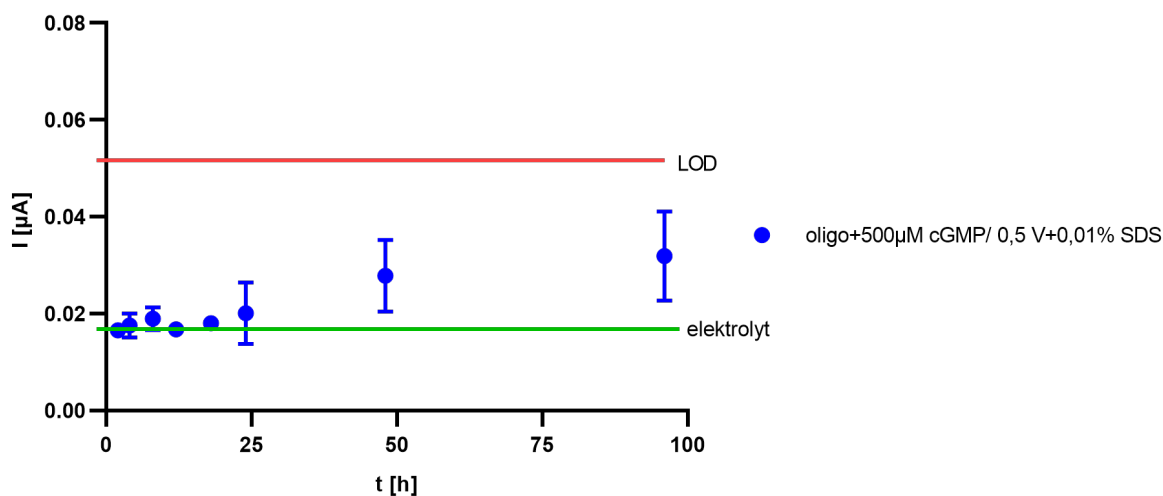
v skôr prevedených experimentoch [2]. Intenzita bandov vzniknutých oligonukleotidov sa zvyšuje s predlžujúcou sa dobou priebehu syntézy. Tento efekt vidieť aj na postupnej klesajúcej intenzite ^{32}P -ATP pri značení produktov dlhších priebehov polymerizácie, čo dokumentuje že polymerizácia prebiehala, aj keď so suboptimálnym výťažkom. Bandy „a“

a „b“ vyskytujúce medzi bandami oligonukleotidov, predstavujú pravdepodobne teplotne závislé degradačné produkty [2].

Analýza vzoriek spontánnej neenzymatickej polymerizácie cGMP bola prevedená na PAGE, pre porovnanie s našou vyvinutou elektrochemickou metódou. Ako vidieť, gélová elektroforéza dokáže rozlíšiť oligonukleotidy podľa ich dĺžky líšiacich sa o 1 nukleotid, ako aj degradačné produkty. Nevýhodou gélovej elektroforézy je časová náročnosť analýzy a práca s rádioaktívne značenými vzorkami. Taktiež pri použití gélovej elektroforézy je zložitejšia kvantitatívna analýza.

4.4.3. Analýza oligonukleotidov pomocou elektrochemickej metódy

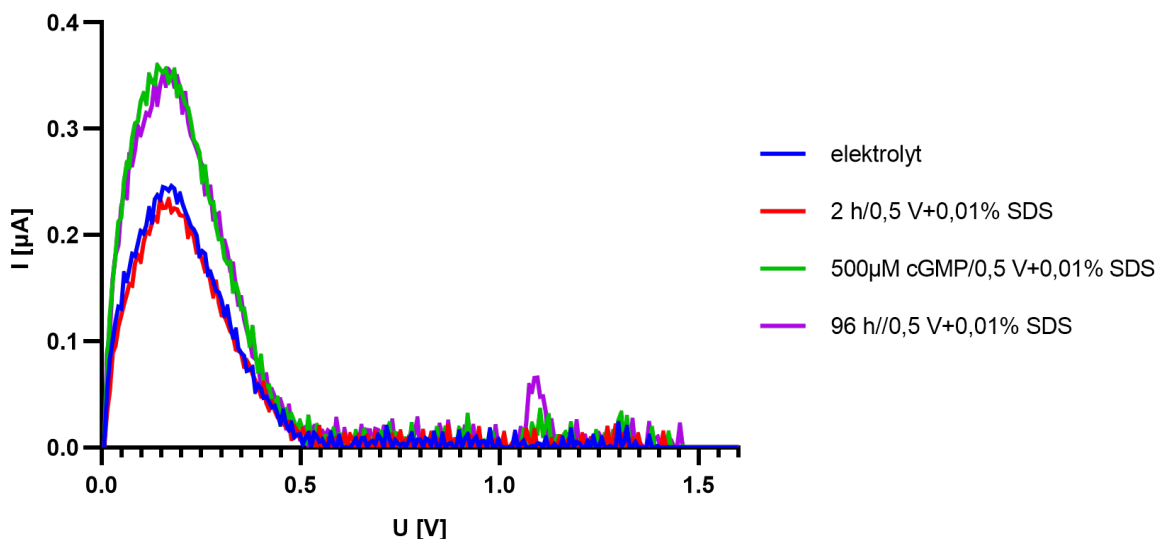
Analýza produktov spontánnej neenzymatickej polymerizácie 3',5' -cGMP (uvedené v časti 4.4.1.) bola prevedená aj nami vyvinutou metódou, ktorá zahrňovala selektívnej desorpcie cGMP pomocou 0,01% SDS v bazickom prostredí na kladne nabitom povrchu PGE a následnou LSV analýzou v acetátovom pufre. Boli použité rovnaké vzorky ako v prípade analýzy na PAGE. Vzorky boli nariedené na výslednú koncentráciu 500 μ M cGMP (pôvodné 3mM) v roztoku 0,3M NaCl, kedy samotné meranie prebehlo v 0,2M acetátovom pufre pH 5.



Obrázek 4.20: Analýza produktov spontánnej neenzymatickej polymerizácie 3',5' -cGMP pomocou selektívnej desorpcie cGMP 0,01% roztokom SDS v bazickom prostredí na kladne nabitom povrchu PGE. Vynesená je závislosť výšky píku G^{ox} na čase priebehu polymerizácie. Zobrazená priamka LOD (červená čiara), ako aj zodpovedajúca priamka pre signál pozadia - elektrolytu (zelená čiara)(n=3).

Na obrázku 4.20 sú vynesené hodnoty maximálnych pík G^{ox} v závislosti na čase počas ktorého prebiehala syntéza. Z grafu vyplýva, že všetky namerané hodnoty G^{ox} pík polymerizačných produktov sa nachádzajú pod LOD (zostrojený ako trojnásobok smerodajnej odchylky pripočítanej k priemeru samotného desorbovaného cGMP). Vzorky sa nedajú

rozlíšiť od nešpecifického signálu vzorky samotného desorbovaného cGMP, kedy hodnoty píkovo a ich rozdielov sú malé a v týchto hodnotách zatažené šumom (obrázok 4.21) (fialová krivka vs. zelená). Je patrný malý nárast hodnoty píku, kedy pri 96 hodinách má najvyššie hodnotu. Hodnoty píkovo po 24 hodinách sa nachádzajú už nad hodnotami elektrolytu, kedy elektrochemické signály korelujú s výsledkami z PAGE, že s narastajúcim časom sa zvyšuje koncentrácia oligonukleotidov. Z analýzy produktov pomocou PAGE ďalej vyplýva, že nami analyzované vzorky obsahovali menej než na PAGE detekovateľné množstvo oligonukleotidov dlhších ako rG₅. Naša metóda v prípade kratších oligonukleotidov rG₄, nie je schopná rozlíšiť pod 1,25 μM koncentráciu. Vzorky neenzymatickej polymerizácie po nariadení teda museli mať nižšiu koncentráciu, ktorú metóda už nie je schopná s istotou určiť.



Obrázok 4.21: Voltamogramy produktov spontánnej neenzymatickej polymerizácie 3', 5'-cGMP (po 2 h a 96 h priebehu syntézy) pomocou metódy založenej na selektívnej desorpcii cGMP 0,01% roztokom SDS v bazickom prostredí na kladne nabitom povrchu PGE.

Pomocou našej elektrochemickej metódy je možné previesť rýchly kvantitatívnu analýzu, ktorá je limitovaná pre oligonukleotidy rG₉ 0,6 μM koncentráciou a pre oligonukleotidy rG₄ 1,25 μM. Pri nižšom obsahu oligonukleotidov nie je možné odlišiť tento signál od nešpecifického signálu nedesorbovaného cGMP, alebo šumu pozadia. Pomocou denaturačného PAGE radioaktívne značených oligonukleotidov je možné určiť aj nižšie koncentrácie. Je možné ďalej určiť zastúpenie jednotlivých dĺžok oligonukleotidov. Naša vyvíjaná metóda by zrejme mohla slúžiť ako paralelna technika pre semi-kvantitatívnu analýzu vznikajúcich oligonukleotidov u vzoriek, kde polymerizácia cGMP prebehla úspešne a ich koncentrácia je nad nami stanoveným limitom detekcie.

5. Záver

Predložená diplomová práca sa zaoberá optimalizáciou elektrochemickej metódy na analýzu vzoriek neenzymatickej polymerizácie cyklických nukleosid monofosfátov. Neenzymatická polymerizácia v podmienkach modelujúcich prebiotické prostredie je súčasťou formamidovej teórie vzniku života. Optimalizácia bola prevedená na modelovom systéme oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku cGMP technikou AdTS LSV. Z dôvodu prekryvu píku oxidácie G poskytovaného cGMP a píku poskytovaného oligonukleotidmi je nutné selektívne desorbovať cGMP z povrchu PGE pred prevedením elektrochemickej analýzy. Prvá časť bola zameraná na selektívnu desorpciu cGMP pomocou premývania detergentov.

Premývaním elektródy 1% Tritonom x-100 dochádzalo k skoro úplnej desorpcii cGMP, zatiaľ čo G^{ox} pík oligonukleotidových reťazcov rG₄ a rG₉ klesol o $\frac{1}{3}$ svojej pôvodnej hodnoty. Znížením koncentrácie roztoku Tritonu x-100 bolo sledované, že desorpcia cGMP nie je úplná, čo znepresňuje merania zmesi s oligonukleotidmi. Najnižšia experimentálne zistená koncentrácia oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku 500 μ M cGMP nad LOD bola 1,25 μ M pre kratší aj dlhší oligonukleotid pri premývaní povrchu elektródy v 1% Tritone x-100. Výška G^{ox} píku nebola lineárne závislá na koncentrácii. G^{ox} pík prudko klesol už pri koncentrácii 5 μ M oligonukleotidu, čo komplikuje kvantitatívnu analýzu oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku cGMP. Samotný Triton x-100 vykazoval navyše oxidačný pík v oblasti 1,5 V.

Premývaním elektródy v roztoku 1% SDS dochádzalo k úplnej desorpcii cGMP. U samotných oligonukleotidov klesla hodnota píku G^{ox} podobne ako v prípade Tritonu x-100, tiež o $\frac{1}{3}$. Pri premývaní elektródy 0,01% SDS došlo k nárastu hodnôt píkov oligonukleotidov, ale cGMP nebolo úplne desorbované. Najnižšia experimentálne stanovená koncentrácia pre oba oligonukleotidy nachádzajúcich sa v 500 μ M cGMP nad LOD bola 1,25 μ M pri premývaní elektródy v 1% roztoku SDS. Závislosť koncentračnej rady na veľkosti píkov bola oveľa strmšia ako v prípade Tritonu x-100, kedy SDS je vhodnejší detergent na analýzu oligonukleotidov nachádzajúcich sa v cGMP, ako Triton x-100.

Posledný testovaný detergent pre selektívnu desorpciu cGMP bol použitý Tween 20. V roztoku 1% Tweenu 20 dochádzalo k skoro úplnej desorpcii cGMP z povrchu PGE. Oxidačný pík oligonukleotidov rG₉ po premývaní 1% Tweenom 20 mal rovnakú hodnotu ako v prípade nepremývaného povrchu elektródy. U samotných kratších oligonukleotidov dochádzalo už k miernej desorpcii asi na $\frac{1}{3}$ pôvodnej hodnoty G^{ox} . 0,1%, 0,5% a 1% Tween desorbujú cGMP s podobnou účinnosťou. Oligonukleotidy nachádzajúce sa v zmesi sú najmenej odstraňované z povrchu elektródy 0,1% Tweenom. Najnižšia experimentálne zistená koncentrácia oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku 500 μ M cGMP nad LOD bola 1,25 μ M pre kratší aj dlhší oligonukleotid pri premývaní povrchu elektródy v 1% Tweene 20. Výšky G^{ox} píkov poskytovanými oligonukleotidmi zo zmesi 500 μ M cGMP po ošetrení elektródy Tweenom 20 mal lineárnu závislosť koncentračnej rady a jej smernica bola strmšia. Tween 20 je najvhodnejším detergentom selektívnej desorpcie cGMP, Jeho využitie umožňuje kvantitatívnu analýzu produktov neenzymatickej polymerizácie 3',5'-cGMP od 1,25 μ M koncentrácie.

Okrem techniky založenej na selektívnej desorpcii cGMP pomocou detergentu, bola vyskúšaná desorbcia cGMP vložení záporného potenciálu na elektródu. Pri vložení $-0,5$ V a -1 V na elektródu v 0,2M acetátovom pufré o pH 5 dochádza ku desorpcii cGMP vplyvom elektrostatického odpudzovania, kedy hodnota píku G^{ox} klesla oproti kontrolnej

nedesorbovanej vzorke asi na polovicu. Táto selektívna desorpcia nie je dostatočná, na analýzu oligonukleotidov nachádzajúcich sa v roztoku cGMP.

Ďalšia z testovaných možností selektívnej desorpcie cGMP bola prevedená pomocou vloženia záporného potenciálu na elektródu vo fosfátovom pufre o pH 12. Tento experiment bol prevedený na základe predpokladu, podľa ktorého sa v bazickom prostredí nabíjajú nukleové báze záporne, čím sa zvyšuje elektrostatické odpudzovanie medzi elektródou a cGMP, alebo elektródou a RNA. Už pri vložení $-0,5$ V dochádza ku desorpcii cGMP, kedy pri vložení -1 V dochádza skoro k úplnému odstráneniu cGMP z povrchu elektródy. Oligonukleotidy rG₉ ostávajú z väčšej časti naadsorbované, kedy u kratších oligonukleotidov rG₄ dochádza ku poklesu G^{ox} asi na $\frac{1}{3}$ hodnoty oproti kontrole. Hodnoty G^{ox} píkov pre vložený záporný potenciál $-0,5$ V a -1 V na elektródu mali rádovo vyššiu hodnotu ako v prípade premývania elektródy detergentom. Účinok vloženého potenciálu $-0,5$ V nebol dostatočný na desorpciu cGMP, kedy experimentálne zistené hodnoty koncentrácií nad LOD boli $2,5\mu\text{M}$ pre krátke oligonukleotidy rG₄ a pre dlhšie oligonukleotidy rG₉ $1,25\mu\text{M}$. Pri vloženom zápornom potenciále -1 V bola hodnota koncentrácie nad LOD $1,25\mu\text{M}$ pre oba oligonukleotidy, kedy dochádzalo k účinnejšej desorpcii cGMP.

Ďalšiou vyskúšaná metóda bola kombinácia vloženého záporného potenciálu -1 V na elektródu, premývanou v 0,01% SDS v bazickom prostredí, kedy experimentálne zistené hodnoty nad LOD boli pre oligo rG₉ $1,25\mu\text{M}$ a pre kratšie oligo rG₄ $2,5\mu\text{M}$.

Posledná vyskúšaná metóda bola selektívna desorpcia cGMP pomocou 0,01% SDS v bazickom prostredí na kladne nabitom povrchu. Toto experimentálne nastavenie vychádzalo z predpokladu, že príťažlivá elektrostatická sila medzi záporne nabitým analytom a kladne nabitým povrchom elektródy povedie ku zníženiu ztrát oligonukleotidov, zatiaľ čo desorpcia cGMP bude stále dostatočne účinná. Detergent SDS bol zvolený, lebo vďaka jeho pôsobeniu dochádzalo k úplnej desorpcii cGMP z povrchu elektródy. Bol zistený účinok kladného potenciálu na zníženie strát dlhších oligonukleotidov rG₉, kedy experimentálne zistená hodnota LOD bola $0,6\mu\text{M}$ pre rG₉ a $1,25\mu\text{M}$ pre rG₄. Táto metóda bola určená z hľadiska analýzy oligonukleotidov vzniklých polymerizáciou cGMP ako najvhodnejšia, vďaka najnižšiemu LOD, úplnému odstráneniu cGMP z povrchu elektródy a lineárnosti závislosti výšky pík na koncentracii.

Po optimalizácii metódy na modelovej zmesi cGMP a syntetických oligonukleotidov bola prevedená analýza produktov spontánnej neenzymatickej polymerizácie 3', 5' cGMP pomocou denaturačnej PAGE. Bolo zistené, že vzorky po priebehu syntézy počas 96 hodín obsahovali najdlhšie oligonukleotidy o dĺžke 5 nukleotidov. Celkový výťažok a získané dĺžky oligonukleotidov boli zrejme z dôvodov nedokonalého vysušenia vzorkou pred polymerizáciou podstatne nižšie, ako v skôr prevedených experimentov [2]. Tieto vzorky boli analyzované rovnako pomocou nami vyvinutej elektrochemickej metódy zahrňujúcej selektívnu desorpciu cGMP pomocou 0,01% SDS v bazickom prostredí na kladne nabitom povrchu. Ani po 96 hodinách priebehu syntézy nedosahoval pík hodnoty nad LOD. Cez neúspech analýzy preliminárnych vzoriek cGMP polymerizácie je pravdepodobné, že u vzoriek, kde neenzymatická polymerizácia prebehne s očakávanou účinnosťou, bude môcť byť naša metóda využitá pre stanovenie obsahu RNA oligonukleotidov. Elektrochemické stanovenie môže v budúcnosti pomôcť s optimalizáciou podmienok prebiotrickej polymerizácie cyklických monofosfátových nukleobází. Naše výsledky poukazujú na nedostatky metódy v porovnaní s gélovou elektroforézou - predovšetkým celková nižšia citlivosť a nemožnosť zistenia distribúcie dĺžkok. Na druhú stranu nami vyvinutá technika môže byť použitá ako paralelná metóda dokazujúca priebeh polymerizácie a ako pre rýchlu a ne-

nákladnú semi-kvantitatívnu analýzu reťazcov RNA. Na rozdiel od gélovej elektroforézy môže byť táto technika použitá k určeniu obsahu bází [77] v experimentoch zahrňujúce polymerizáciu ostatných cyklických nukleosid monofosfátov a ich zmesí [2, 69, 92].

Okrem využitia metódy pre analýzu produktov neenzymatickej polymerizácie môže byť nami vyvinutá metóda použitá pre analýzu produktov enzymatických reakcií, pre detekciu DNA hybridizácie alebo zisťovanie poškodenia DNA [93].

Literatura

- [1] PALEČEK, Emil a Martin BARTOŠÍK. Electrochemistry of Nucleic Acids. *Chemical Reviews* . 2012, **112**(6), 3427-3481. DOI: 10.1021/cr200303p. ISSN 0009-2665.
- [2] ŠPONER, Judit E., Jiří ŠPONER, Alessandra GIORGI, Ernesto DI MAURO, Samanta PINO a Giovanna COSTANZO. Untemplated Nonenzymatic Polymerization of 3,5cGMP: A Plausible Route to 3,5-Linked Oligonucleotides in Primordia. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2015, **119**(7), 2979-2989. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b00601. ISSN 1520-6106.
- [3] SALADINO, Raffaele, Claudia CRESTINI, Samanta PINO, Giovanna COSTANZO a Ernesto DI MAURO. Formamide and the origin of life. *Physics of Life Reviews*. 2012, **9**(1), 84-104. DOI: 10.1016/j.plrev.2011.12.002. ISSN 15710645.
- [4] OPARIN, Alexander Ivanovič. *The Origin of Life on the Earth*. New York: ACADEMIC PRESS, 1957. ISBN 978-1-4831-9737-1.
- [5] MILLER, S. L. a H. C. UREY. Organic Compound Syntheses on the Primitive Earth: Several questions about the origin of life have been answered, but much remains to be studied. *Science*. 1959, 130(3370), 245-251. DOI: 10.1126/science.130.3370.245. ISSN 0036-8075.
- [6] MILLER, S. L. A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions. *Science*. 1953, 117(3046), 528-529. DOI: 10.1126/science.117.3046.528. ISSN 0036-8075.
- [7] MILLER, Stanley L. The mechanism of synthesis of amino acids by electric discharges. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1957, 23, 480-489. DOI: 10.1016/0006-3002(57)90366-9. ISSN 00063002.
- [8] KASTING, J. Earth's early atmosphere. *Science*. 1993, 259(5097), 920-926. DOI: 10.1126/science.11536547. ISSN 0036-8075.
- [9] ORÓ, J. Mechanism of Synthesis of Adenine from Hydrogen Cyanide under Possible Primitive Earth Conditions. *Nature*. 1961, 191(4794), 1193-1194. DOI: 10.1038/1911193a0. ISSN 0028-0836.
- [10] MIZUNO, Takashi a Alvin H. WEISS. Synthesis and Utilization of Formose Sugars. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry Volume 29*. Elsevier, 1974, 1974, s. 173-227. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. DOI: 10.1016/S0065-2318(08)60250-4. ISBN 9780120072293.
- [11] LESLIE E., Orgel. Prebiotic Chemistry and the Origin of the RNA World. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2010, 39(2), 99-123. DOI: 10.1080/10409230490460765. ISSN 1040-9238.
- [12] TRIFONOV, Edward N. Vocabulary of Definitions of Life Suggests a Definition. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2011, 29(2), 259-266. DOI: 10.1080/073911011010524992. ISSN 0739-1102.

- [13] WATSON, J. D. a F. H. C. CRICK. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953, 171(4356), 737-738. DOI: 10.1038/171737a0. ISSN 0028-0836.
- [14] DODD, Matthew S., Dominic PAPINEAU, Tor GRENNE, John F. SLACK, Martin RITTNER, Franco PIRAJNO, Jonathan O'NEIL a Crispin T. S. LITTLE. Evidence for early life in Earth's oldest hydrothermal vent precipitates. *Nature*. 2017, **543**(7643), 60-64. DOI: 10.1038/nature21377. ISSN 0028-0836.
- [15] BERNHARDT, Harold S. The RNA world hypothesis: the worst theory of the early evolution of life (except for all the others). *Biology Direct*. 2012, 7(1) [cit. 2019-03-05]. DOI: 10.1186/1745-6150-7-23. ISSN 1745-6150.
- [16] BELL, Graham. *The Basics of Selection*. Boston, MA: Springer US, 1997. ISBN 978-0-412-05531-7.
- [17] KRUGER, Kelly, Paula J. GRABOWSKI, Arthur J. ZAUG, Julie SANDS, Daniel E. GOTTSCHLING a Thomas R. CECH. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell*. 1982, 31(1), 147-157. DOI: 10.1016/0092-8674(82)90414-7. ISSN 00928674.
- [18] HILLER, D. A. a S. A. STROBEL. The chemical versatility of RNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011, 366(1580), 2929-2935. DOI: 10.1098/rstb.2011.0143. ISSN 0962-8436.
- [19] FEDOR, Martha J. a James R. WILLIAMSON. The catalytic diversity of RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005, 6(5), 399-412. DOI: 10.1038/nrm1647. ISSN 1471-0072.
- [20] OIVANEN, Mikko, Satu KUUSELA a Harri LÖNNBERG. Kinetics and Mechanisms for the Cleavage and Isomerization of the Phosphodiester Bonds of RNA by Brønsted Acids and Bases. *Chemical Reviews*. 1998, 98(3), 961-990. DOI: 10.1021/cr960425x. ISSN 0009-2665.
- [21] MORSE, John W. a Fred T. MACKENZIE. Hadean ocean carbonate geochemistry. *Aquatic Geochemistry*. 4(3/4), 301-319 . DOI: 10.1023/A:1009632230875. ISSN 13806165.
- [22] MAHER, Kevin A. a David J. STEVENSON. Impact frustration of the origin of life. *Nature*. 1988, 331(6157), 612-614. DOI: 10.1038/331612a0. ISSN 0028-0836.
- [23] SALADINO, Raffaele, Claudia CRESTINI, Fabiana CICIRIELLO, Giovanna COSTANZO a Ernesto DI MAURO. Formamide Chemistry and the Origin of Informational Polymers. *Chemistry & Biodiversity*. 2007, 4(4), 694-720. DOI: 10.1002/cbdv.200790059. ISSN 16121872.
- [24] SALADINO, Raffaele, Claudia CRESTINI, Giovanna COSTANZO a Ernesto DI MAURO. On the Prebiotic Synthesis of Nucleobases, Nucleotides, Oligonucleotides, Pre-RNA and Pre-DNA Molecules. WALDE, Peter, ed. *Prebiotic Chemistry*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, s. 29-68. Topics in Current Chemistry. DOI: 10.1007/b136152. ISBN 3-540-27759-5.

- [25] MIYAKAWA, Shin, H. JAMES CLEAVES a Stanley L. MILLER. The Cold Origin of Life: A. Implications Based On The Hydrolytic Stabilities Of Hydrogen Cyanide And Formamide *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. 32(3), 195-208. DOI: 10.1023/A:1016514305984. ISSN 01696149.
- [26] SALADINO, Raffaele, Claudia CRESTINI, Veronica NERI, John R. BRUCATO, Luigi COLANGELI, Fabiana CICIRIELLO, Ernesto DI MAURO a Giovanna COSTANZO. Synthesis and Degradation of Nucleic Acid Components by Formamide and Cosmic Dust Analogues. *ChemBioChem*. 2005, 6(8), 1368-1374. DOI: 10.1002/cbic.200500035. ISSN 14394227.
- [27] NEVEU, Marc, Hyo-Joong KIM a Steven A. BENNER. The “Strong” RNA World Hypothesis: Fifty Years Old. *Astrobiology*. 2013, 13(4), 391-403. DOI: 10.1089/ast.2012.0868. ISSN 1531-1074.
- [28] BENNER, Steven A. Paradoxes in the Origin of Life. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. 2014, 44(4), 339-343. DOI: 10.1007/s11084-014-9379-0. ISSN 0169-6149.
- [29] ZIEGLER, Eric W., Hyo-Joong KIM a Steven A. BENNER. Molybdenum(VI)-Catalyzed Rearrangement of Prebiotic Carbohydrates in Formamide, a Candidate Prebiotic Solvent. *Astrobiology*. 2018, 18(9), 1159-1170. DOI: 10.1089/ast.2017.1742. ISSN 1531-1074.
- [30] SALADINO, Raffaele, Giorgia BOTTA, Samanta PINO, Giovanna COSTANZO a Ernesto DI MAURO. Genetics first or metabolism first? The formamide clue. *Chemical Society Reviews*. 2012, 41(16). DOI: 10.1039/c2cs35066a. ISSN 0306-0012.
- [31] Koike, T., Kaneko, T., Kobayashi, K., Miyakawa, S., & Takano, Y. (2003). Formation of organic compounds from simulated Titan atmosphere: perspectives of the Cassini mission. *Biological in Space*, 17 3, 188-9.
- [32] GERAKINES, P.A., M.H. MOORE a R.L. HUDSON. Ultraviolet photolysis and proton irradiation of astrophysical ice analogs containing hydrogen cyanide. *Icarus*. 2004, 170(1), 202-213. DOI: 10.1016/j.icarus.2004.02.005. ISSN 00191035.
- [33] TAKANO, Yoshinori, Taiki TSUBOI, Takeo KANEKO, Kensei KOBAYASHI a Katsumi MARUMO. Pyrolysis of High-Molecular-Weight Complex Organics Synthesized from a Simulated Interstellar Gas Mixture Irradiated with 3 MeV Proton Beam. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 2004, 77(4), 779-783. DOI: 10.1246/bcsj.77.779. ISSN 0009-2673.
- [34] BERNSTEIN, M.P, L.J ALLAMANDOLA a S.A SANDFORD. Complex organics in laboratory simulations of interstellar/cometary ices. *Advances in Space Research*. 1997, 19(7), 991-998. DOI: 10.1016/S0273-1177(97)00340-2. ISSN 02731177.
- [35] WOON, David E. Ab initio quantum chemical studies of reactions in astrophysical ices. 4. Reactions in ices involving HCOOH, CH₂NH, HCN, HNC, NH₃, and H₂O. *International Journal of Quantum Chemistry*. 2002, 88(1), 226-235. DOI: 10.1002/qua.10082. ISSN 0020-7608.

- [36] SHAPIRO, Robert. Comments on 'Concentration by Evaporation and the Prebiotic Synthesis of Cytosine. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*. **32**(3), 275-278. DOI: 10.1023/A:1016582308525. ISSN 01696149.
- [37] NGUYEN, T. T. Infrared Spectroscopic Study of the Formamide-Na-Montmorillonite Complex. Conversion of s-Triazine to Formamide. *Clays and Clay Minerals*. 1986, **34**(5), 521-528. DOI: 10.1346/CCMN.1986.0340504. ISSN 0009-8604
- [38] CHURCHMAN, G. J. a B. K. G. THENG. Interactions of halloysites with amides: mineralogical factors affecting complex formation. *Clay Minerals*. 1984, **19**(02), 161-175. DOI: 10.1180/claymin.1984.019.2.04. ISSN 0009-8558.
- [39] ŠPONER, Judit E., Jiří ŠPONER, Olga NOVÁKOVÁ, et al. Emergence of the First Catalytic Oligonucleotides in a Formamide-Based Origin Scenario. *Chemistry - A European Journal*. 2016, **22**(11), 3572-3586. DOI: 10.1002/chem.201503906. ISSN 09476539.
- [40] NGUYEN, Vinh Son, Heather L. ABBOTT, M. Michele DAWLEY, Thomas M. ORLANDO, Jerzy LESZCZYNSKI a Minh Tho NGUYEN. Theoretical Study of Formamide Decomposition Pathways. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2011, **115**(5), 841-851. DOI:10.1021/jp109143j. ISSN 1089-5639.
- [41] DRURY, David J. a UPDATED BY STAFF. Formic Acid. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2000, 2013-04-19. DOI: 10.1002/0471238961.0615181304182118.a01.pub2. ISBN 0471238961.
- [42] SALADINO, Raffaele, Claudia CRESTINI, Fabiana CICIRIELLO, Samanta PINO, Giovanna COSTANZO a Ernesto DI MAURO. From formamide to RNA: the roles of formamide and water in the evolution of chemical information. *Research in Microbiology*. 2009, **160**(7), 441-448. DOI: 10.1016/j.resmic.2009.06.001. ISSN 09232508.
- [43] CATALDO, Franco, Giacomo PATANÈ a Giuseppe COMPAGNINI. Synthesis of HCN Polymer from Thermal Decomposition of Formamide. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. 2009, **46**(11), 1039-1048. DOI: 10.1080/10601320903245342. ISSN 1060-1325.
- [44] AKHTER, M.Salim a Sadeq M. ALAWI. A comparison of micelle formation of ionic surfactants in formamide, in N-methylformamide and in N,N-dimethylformamide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2003, **219**(1-3), 281-290 . DOI: 10.1016/S0927-7757(03)00055-4. ISSN 09277757.
- [45] SALADINO, R. A possible prebiotic synthesis of purine, adenine, cytosine, and 4(3H)-pyrimidinone from formamide implications for the origin of life. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **9**(5), 1249-1253. DOI: 10.1016/S0968-0896(00)00340-0. ISSN 09680896.
- [46] BERKESSEL, Albrecht. Biomimetic and organocatalytic approaches to oxidation catalysis. *Pure and Applied Chemistry*. 2005, **77**(7), 1277-1284. DOI: 10.1351/pac200577071277. ISSN 1365-3075.

- [47] SALADINO, Raffaele, Enrico MINCIONE, Claudia CRESTINI, Rodolfo NEGRI, Ernesto DI MAURO a Giovanna COSTANZO. Mechanism of Degradation of Purine Nucleosides by Formamide. Implications for Chemical DNA Sequencing Procedures †. *Journal of the American Chemical Society*. 1996, **118**(24), 5615-5619. DOI: 10.1021/ja953527y. ISSN 0002-7863.
- [48] SALADINO, Raffaele, Claudia CRESTINI, Enrico MINCIONE, Giovanna COSTANZO, Ernesto DI MAURO a Rodolfo NEGRI. Mechanism of degradation of 2-deoxycytidine by formamide: Implications for chemical DNA sequencing procedures. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1997, **5**(11), 2041-2048. DOI: 10.1016/S0968-0896(97)00140-5. ISSN 09680896.
- [49] MILLER, Stanley L. a Jeffrey L. BADA. Submarine hot springs and the origin of life. *Nature*. 1988, **334**(6183), 609-611. DOI: 10.1038/334609a0. ISSN 0028-0836.
- [50] SALADINO, Raffaele, Claudia CRESTINI, Veronica NERI, Fabiana CICIRIELLO, Giovanna COSTANZO a Ernesto DI MAURO. Origin of Informational Polymers: The Concurrent Roles of Formamide and Phosphates. *ChemBioChem*. 2006, **7**(11), 1707-1714 . DOI: 10.1002/cbic.200600139. ISSN 14394227.
- [51] YAMADA, Hiroshi, Masaaki HIROBE, Kimio HIGASHIYAMA, Hiroshi TAKAHASHI a Kazuo T. SUZUKI. Reaction mechanism for purine ring formation as studied by ¹³C-¹⁵N coupling. *Tetrahedron Letters*. 1978, **19**(42), 4039-4042. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)95134-2. ISSN 00404039.
- [52] YAMADA, Hiroshi, Masaaki HIROBE, Kimio HIGASHIYAMA, Hiroshi TAKAHASHI a Kazuo T. SUZUKI. Detection of carbon-13-nitrogen-15 coupled units in adenine derived from doubly labeled hydrogen cyanide or formamide. *Journal of the American Chemical Society*. 1978, **100**(14), 4617-4618. DOI: 10.1021/ja00482a061. ISSN 0002-7863.
- [53] ROBERTSON, Michael P. a Stanley L. MILLER. An efficient prebiotic synthesis of cytosine and uracil. *Nature*. 1995, **375**(6534), 772-774. DOI: 10.1038/375772a0. ISSN 0028-0836.
- [54] ŠPONER, Judit E., Jiří ŠPONER a Miguel FUENTES-CABRERA. Prebiotic Routes to Nucleosides: A Quantum Chemical Insight into the Energetics of the Multistep Reaction Pathways. *Chemistry - A European Journal*. 2011, **17**(3), 847-854. DOI: 10.1002/chem.201002057. ISSN 09476539.
- [55] INGAR, Abdul-Aziz, Richard W. A. LUKE, Barry R. HAYTER a John D. SUTHERLAND. Synthesis of Cytidine Ribonucleotides by Stepwise Assembly of the Heterocycle on a Sugar Phosphate. *ChemBioChem*. 2003, **4**(6), 504-507. DOI: 10.1002/cbic.200300554. ISSN 14394227.
- [56] FULLER, W. D., R. A. SANCHEZ a L. E. ORGEL. Studies in prebiotic synthesis. VII. *Journal of Molecular Evolution*. 1972, **1**(3), 249-257. DOI: 10.1007/BF01660244. ISSN 0022-2844.

- [57] SALADINO, Raffaele, Umberto CIAMBECCHINI, Claudia CRESTINI, Giovanna COSTANZO, Rodolfo NEGRI a Ernesto DI MAURO. One-Pot TiO₂-Catalyzed Synthesis of Nucleic Bases and Acyclonucleosides from Formamide: Implications for the Origin of Life. *ChemBioChem*. 2003, **4**(6), 514-521. DOI: 10.1002/cbic.200300567. ISSN 14394227.
- [58] ČECHOVÁ, Lucie, Petr JANSÁ, Michal ŠÁLA, Martin DRAČÍNSKÝ, Antonín HOLÝ a Zlatko JANEBA. The optimized microwave-assisted decomposition of formamides and its synthetic utility in the amination reactions of purines. *Tetrahedron*. 2011, **67**(5), 866-871 . DOI: 10.1016/j.tet.2010.12.040. ISSN 00404020.
- [59] BRESLOW, Ronald. On the mechanism of the formose reaction. *Tetrahedron Letters*. 1959, **1**(21), 22-26. DOI: 10.1016/S0040-4039(01)99487-0. ISSN 00404039.
- [60] LOHRMANN, R. a L. E. ORGEL. Urea-Inorganic Phosphate Mixtures as Prebiotic Phosphorylating Agents. *Science*. 1971, **171**(3970), 490-494. DOI: 10.1126/science.171.3970.490. ISSN 0036-8075.
- [61] COSTANZO, Giovanna, Raffaele SALADINO, Claudia CRESTINI, Fabiana CIRIELLO a Ernesto DI MAURO. Nucleoside Phosphorylation by Phosphate Minerals. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, **282**(23), 16729-16735. DOI: 10.1074/jbc.M611346200. ISSN 0021-9258.
- [62] LOPEZ, Xabier, Annick DEJAEGERE, Fabrice LECLERC, Darrin M. YORK a Martin KARPLUS. Nucleophilic Attack on Phosphate Diesters: A Density Functional Study of In-Line Reactivity in Dianionic, Monoanionic, and Neutral Systems. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006, **110**(23), 11525-11539. DOI: 10.1021/jp0603942. ISSN 1520-6106.
- [63] STURTEVAN, Julian M., J. A. GERLT a F. H. WESTHEIMER. Enthalpy of hydrolysis of simple phosphate diesters. *Journal of the American Chemical Society*. 1973, **95**(24), 8168-8169. DOI: 10.1021/ja00805a036. ISSN 0002-7863.
- [64] VERLANDER, M. S., R. LOHRMANN a L. E. ORGEL. Catalysts for the self-polymerization of adenosine cyclic 2,3-phosphate. *Journal of Molecular Evolution*. 1973, **2**(4), 303-316. DOI: 10.1007/BF01654098. ISSN 0022-2844.
- [65] USHER, D. A. a D. YEE. Geometry of the dry-state oligomerization of 2,3-cyclic phosphates. *Journal Of Molecular Evolution*. 1979, **13**(4), 287-293. DOI: 10.1007/BF01731369. ISSN 0022-2844.
- [66] ENGELHART, A. E. a N. V. HUD. Primitive Genetic Polymers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010, **2**(12), a002196-a002196. DOI: 10.1101/cshperspect.a002196. ISSN 1943-0264.
- [67] ŠPONER, Judit E., Jiří ŠPONER a Ernesto Di MAURO. New evolutionary insights into the non-enzymatic origin of RNA oligomers. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2017, **8**(3) . DOI: 10.1002/wrna.1400. ISSN 17577004.

- [68] BROWN, Reid F., Casey T. ANDREWS a Adrian H. ELCOCK. Stacking Free Energies of All DNA and RNA Nucleoside Pairs and Dinucleoside-Monophosphates Computed Using Recently Revised AMBER Parameters and Compared with Experiment. *Journal of Chemical Theory and Computation* . 2015, **11**(5), 2315-2328 . DOI: 10.1021/ct501170h. ISSN 1549-9618.
- [69] COSTANZO, Giovanna, Samanta PINO, Anna Maria TIMPERIO, et al. Non-Enzymatic Oligomerization of 3', 5' Cyclic AMP. *PLOS ONE*. 2016, **11**(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0165723. ISSN 1932-6203.
- [70] STADLBAUER, Petr, Jiří ŠPONER, Giovanna COSTANZO, Ernesto DI MAURO, Samanta PINO a Judit E. ŠPONER. Tetraloop-like Geometries Could Form the Basis of the Catalytic Activity of the Most Ancient Ribooligonucleotides. *Chemistry - A European Journal*. 2015, **21**(9), 3596-3604. DOI: 10.1002/chem.201406140. ISSN 09476539.
- [71] CICIRIELLO, Fabiana, Giovanna COSTANZO, Samanta PINO, Claudia CRES-TINI, Raffaele SALADINO a Ernesto DI MAURO. Molecular Complexity Favors the Evolution of Ribopolymers †. *Biochemistry*. 2008, **47**(9), 2732-2742. DOI: 10.1021/bi7021014. ISSN 0006-2960.
- [72] COSTANZO, Giovanna, Raffaele SALADINO, Giorgia BOTTA, Alessandra GI-ORGI, Anita SCIPIONI, Samanta PINO a Ernesto DI MAURO. Generation of RNA Molecules by a Base-Catalysed Click-Like Reaction. *ChemBioChem*. 2012, **13**(7), 999-1008. DOI: 10.1002/cbic.201200068. ISSN 14394227.
- [73] BARD, Allen J. a Larry R. FAULKNER. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed. New York: Wiley, c2001. ISBN 978-0-471-04372-0.
- [74] NAHIR, Tal M., Rose A. CLARK a Edmond F. BOWDEN. Linear-Sweep Voltammetry of Irreversible Electron Transfer in Surface-Confined Species Using the Marcus Theory. *Analytical Chemistry*. 2002, **66**(15), 2595-2598. DOI: 10.1021/ac00087a027. ISSN 0003-2700.
- [75] PALEČEK, EMIL. Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyri-bonucleic Acid. *Nature*. 1960, **188**(4751), 656-657 . DOI: 10.1038/188656a0. ISSN 0028-0836.
- [76] Vacek, J., L. Havran, M. Fojta. 2011. Elektrochemická analýza poškození, hybridizace a dalších interakcí DNA. *Chemické Listy* 105:15-26
- [77] ŠPAČEK, Jan, Aleš DAŇHEL, Stanislav HASONĚ a Miroslav FOJTA. Label-free detection of canonical DNA bases, uracil and 5-methylcytosine in DNA oligonucleotides using linear sweep voltammetry at a pyrolytic graphite electrode. *Electrochemistry Communications*. 2017, **82**, 34-38. DOI: 10.1016/j.elecom.2017.07.013. ISSN 13882481.
- [78] PALEČEK, Emil, Miroslav FOJTA, František JELEN a Vladimír VETTERL. Electrochemical Analysis of Nucleic Acids. BARD, Allen J., ed. *Encyclopedia of Electrochemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2007, 2007-12-15. DOI: 10.1002/9783527610426.bard090012. ISBN 3527610421.

- [79] FOJTA, Miroslav. Mercury Electrodes in Nucleic Acid Electrochemistry: Sensitive Analytical Tools and Probes of DNA Structure. A Review. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 2004, **69**(4), 715-747 . DOI: 10.1135/cccc20040715. ISSN 0010-0765.
- [80] DRYHURST, Glenn a Gerald F. PACE. Electrochemical Oxidation of Guanine at the Pyrolytic Graphite Electrode. *Journal of The Electrochemical Society*. 1970, **117**(10). DOI: 10.1149/1.2407283. ISSN 00134651.
- [81] SUBRAMANIAN, P. a Glenn DRYHURST. Electrochemical oxidation of guanosine formation of some novel guanine oligonucleosides. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1987, **224**(1-2), 137-162. DOI: 10.1016/0022-0728(87)85089-1. ISSN 00220728.
- [82] GOYAL, Rajendra N. a Aikta DHAWAN. Oxidation chemistry of 2-deoxyadenosine at pyrolytic graphite electrode. *Bioelectrochemistry*. 2006, **69**(2), 223-233. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2006.03.003. ISSN 15675394.
- [83] PALEČEK, Emil a Irena POSTBIEGLOVÁ. Adsorptive stripping voltammetry of biomacromolecules with transfer of the adsorbed layer. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1986, **214**(1-2), 359-371 . DOI: 10.1016/0022-0728(86)80108-5. ISSN 00220728.
- [84] FOJTA, Miroslav a Emil PALEČEK. Supercoiled DNA-modified mercury electrode: A highly sensitive tool for the detection of DNA damage. *Analytica Chimica Acta*. 1997, **342**(1), 1-12. DOI: 10.1016/S0003-2670(96)00551-X. ISSN 00032670.
- [85] WANG, Joseph, Soledad BOLLO, Jose Luis LOPEZ PAZ, Eskil SAHLIN a Baidehi MUKHERJEE. Ultratrace Measurements of Nucleic Acids by Baseline-Corrected Adsorptive Stripping Square-Wave Voltammetry. *Analytical Chemistry*. 1999, **71**(9), 1910-1913. DOI: 10.1021/ac981432j. ISSN 0003-2700.
- [86] FOJTA, Miroslav, Richard P. BOWATER, Veronika STAŇKOVÁ, Luděk HAVRAN, David M. J. LILLEY a Emil PALEČEK. Two Superhelix Density-Dependent DNA Transitions Detected by Changes in DNA Adsorption/Desorption Behavior †. *Biochemistry*. 1998, **37**(14), 4853-4862. DOI: 10.1021/bi9729559. ISSN 0006-2960.
- [87] KIM, Young-Kook, Jinah YEO, Boseon KIM, Minju HA a V. Narry KIM. Short Structured RNAs with Low GC Content Are Selectively Lost during Extraction from a Small Number of Cells. *Molecular Cell*. 2012, **46**(6), 893-895. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.05.036. ISSN 10972765.
- [88] MINHUA FENG, Antonia BERDUGO MORALES, Andre POOT, Tom BEUGELING a Adriaan BANTJES. Effects of Tween 20 on the desorption of proteins from polymer surfaces. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2012, **7**(5), 415-424 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1163/156856295X00427. ISSN 0920-5063.
- [89] THAPLYAL, Pallavi a Philip C. BEVILACQUA. Experimental Approaches for Measuring pKa's in RNA and DNA. *Riboswitch Discovery, Structure and Function* . Elsevier, 2014, 2014, s. 189-219. Methods in Enzymology. DOI: 10.1016/B978-0-12-801122-5.00009-X. ISBN 9780128011225.

- [90] BRABEC, Viktor a Glenn DRYHURST. Electrochemical behavior of natural and biosynthetic polynucleotides at the pyrolytic graphite electrode A new probe for studies of polynucleotide structure and reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1978, **89**(1), 161-173. DOI: 10.1016/S0022-0728(78)80041-2. ISSN 00220728.
- [91] DAŇHEL, Aleš, Luděk HAVRAN, Libuše TRNKOVÁ a Miroslav FOJTA. Hydrogen Evolution Facilitates Reduction of DNA Guanine Residues at the Hanging Mercury Drop Electrode: Evidence for a Chemical Mechanism. *Electroanalysis*. 2016, **28**(11), 2785-2790. DOI: 10.1002/elan.201600242. ISSN 10400397.
- [92] COSTANZO, Giovanna, Alessandra GIORGI, Anita SCIPIONI, et al. Nonenzymatic Oligomerization of 3,5-Cyclic CMP Induced by Proton and UV Irradiation Hints at a Nonfastidious Origin of RNA. *ChemBioChem*. 2017, **18**(15), 1535-1543. DOI: 10.1002/cbic.201700122. ISSN 14394227.
- [93] HOCEK, Michal a Miroslav FOJTA. Nucleobase modification as redox DNA labeling for electrochemical detection. *Chemical Society Reviews*. 2011, **40**(12). DOI: 10.1039/c1cs15049a. ISSN 0306-0012.