



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ELEKTROCHEMICKÝ BIOSENZOR PRO STUDIUM METYLACE DNA

ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR THE STUDY OF DNA METHYLATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jakub Petrula

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. et Ing. David Hynek, Ph.D.

BRNO 2017

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor **Biomedicínské inženýrství a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Student: Bc. Jakub Petrula

ID: 146201

Ročník: 2

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Elektrochemický biosenzor pro studium metylace DNA

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte rešerši v na téma biosenzory pro detekci metylace DNA. 2) Seznamte se se základními elektrochemickými metodami a principem konstrukce biosenzorů. 3) Navrhněte a optimalizujte nový citlivý elektrochemický biosenzor pro studium metylace DNA. 4) Tento biosenzor otestujte na reálném vzorku. 5) Zpracujte a vyhodnoťte výsledky a proveďte diskuzi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] YIN, H. et al. Electrochemical biosensor for DNA demethylase detection based on demethylation triggered endonuclease BstUI and Exonuclease III digestion. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, sv. 66, s. 266-270. ISSN 0956-5663.

[2] TALEAT, Z. et al. Detection strategies for methylated and hypermethylated DNA. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2015, sv. 66, s. 80-89. ISSN 0165-9936.

[3] WANG, G. L. et al. Electrochemical strategy for sensing DNA methylation and DNA methyltransferase activity. *Analytica Chimica Acta*, 2013, sv. 768, s. 76-81. ISSN 0003-2670.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 19.5.2017

Vedoucí práce: Ing. et Ing. David Hynek, Ph.D.

Konzultant:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

Abstrakt

Táto diplomová práca sa zaoberá návrhom a optimalizáciou senzoru a biosenzoru pre detekciu metylovanej DNA. Teoretická časť práce vysvetľuje mechanizmus a význam metylácie DNA a analytické metódy, ktoré sa v súvislosti s ňou využívajú. V ďalšej časti sú opísané niektoré základné metódy detekcie DNA, ktoré sú rozdelené na priame a nepriame. Experimentálna časť práce je rozdelená do niekoľkých blokov. Prvý blok sa venuje modifikácii elektródy a následnej optimalizácii zvolenej metódy detekcie. V druhom bloku sú následne predstavené dva rôzne prístupy detekcie metylácie DNA, na základe priamej detekcie a detekcie prostredníctvom biosenzoru. Záverečný blok sa venuje stanoveniu metylcytozínu vo vzorku prostredníctvom sledovania charakteristických vlastností signálu a numerického výpočtu založeného na metóde „curve fitting“.

Klíčová slova

DNA, metylácia, analýza DNA, detekcia DNA, elektrochémia, biosenzor, uhlíkové nanotrúbice

Abstract

This bachelor's thesis deals with design and optimisation of custom biosensor for detection of methylated DNA. Theoretical part explains the mechanism and importance of DNA methylation. Next section describes analytical methods used in connection with DNA methylation and some basic direct and indirect methods of detection. Final part is dedicated to experiment itself, which is divided into several sections. Section one deals with modification of working electrode and optimisation of detection method. Second section introduces two different ways of DNA methylation detection. First is based on direct detection and second one on detection through the biosensor. Final part shows determination of methylcytosine from sample based on analysing characteristic attributes of signal and numeric algorithm based on curve fitting.

Keywords

DNA, methylation, DNA analysis, DNA detection, electrochemistry, biosensor, carbon nanotubes

Bibliografická citace:

PETRULA, J. *Elektrochemický biosenzor pro studium metylace DNA*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 59s. Vedoucí práce: Ing. et Ing. David Hynek, PhD

Prohlášení

„Prohlašuji, že svou závěrečnou práci na téma Elektrochemický biosenzor pro studium metylace DNA jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené závěrečné práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této závěrečné práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne **19. května 2017**

.....
podpis autora

Poděkování

Ďakujem vedúcemu práce Ing. et Ing. Davidovi Hynekovi, Ph.D. za odborné vedenie pri vypracovaní tejto práce. Ďalej ďakujem Ing. Zuzane Koudelkovej za jej praktické rady, pomoc a trpezlivosť počas práce v laboratóriu.

V Brně dne **19. května 2017**

.....
podpis autora

Obsah

1	Úvod	11
2	Epigenetické modifikácie.....	12
2.1	História	12
2.2	Metylácia DNA.....	13
2.2.1	Mechanizmus DNA metylácie.....	14
2.2.2	DNA metyltransferázy.....	15
2.2.3	Demetylácia.....	15
2.2.4	Poruchy metylácie	16
2.3	Inhibícia metylácie DNA.....	17
3	analytické metódy	18
3.1	Metylačne citlivé restričné endonukleázy	18
3.2	Modifikácia bisulfidom	19
3.2.1	Priame bisulfidové skenovanie.....	19
3.2.2	Bisulfidové pyrosekvenovanie.....	19
3.3	COBRA.....	20
3.4	Vysokoúčinná separácia.....	20
3.4.1	HPLC.....	20
3.4.2	HPCE.....	21
3.5	Imunoprecipitácia	21
3.6	„High – through sekvenovanie“	21
4	elektrochémia	22
4.1	Rozdelenie elektród	23
4.2	Elektródové systémy	23
4.2.1	Pracovná elektróda	25
4.2.2	Referenčná elektróda	25
4.2.3	Pomocná elektróda.....	25
4.3	Priame elektrochemické metódy.....	25
4.3.1	Polarografia.....	26
4.3.2	Voltametria.....	27
4.3.3	Cyklická voltametria	27
4.3.4	Diferenčná pulzná voltametria	28
4.3.5	Square wave voltametria	29
4.4	Detekcia s využitím biosenzoru	29
4.5	Fotoelektrochemické metódy	30
5	Uhlíkové nanotrúbice.....	32
5.1	Štruktúra a vlastnosti.....	32
6	Experimentálny plán	33

7	Materiály a metódy	34
7.1	Chemikálie	34
7.2	Prístrojové a softwarové vybavenie	34
7.3	Príprava roztokov pre modifikáciu GCE	34
7.4	Príprava pufru a roztokov báz.....	35
7.5	Modifikácia elektródy	35
7.6	Diferenčná pulzná voltametria.....	36
7.7	Metóda priamej detekcie	36
7.8	Hybridizácia cieľovej vzorky pri detekcii biosenzorom	37
7.9	Práca s programom MagicPlot.....	39
8	Výsledky	40
8.1	Optimalizácia elektrochemickej detekcie DNA	40
8.1.1	Voľba detekčného okna	40
8.1.2	Depozičný čas	41
8.1.3	Scan rate	42
8.1.4	Amplitúda.....	43
8.2	Priama detekcia.....	44
8.2.1	Kalibračné krivky	44
8.3	Hodnotenie stability elektród.....	45
8.3.1	Interferencia bází s 5-mC.....	46
8.4	Detekcia biosenzorom	49
9	Diskusia	52
9.1	Vplyv jednotlivých krokov úpravy GCE na výsledok	52
9.2	Optimalizácia metódy	53
9.3	Stanovenie jednotlivých báz a vzájomná interferencia	54
9.4	Stanovenie 5-metylcytozínu priamou detekciou	54
9.5	Stanovenie 5-metylcytozínu pomocou biosenzoru	55
9.6	Porovnanie metód	56
10	Záver	57

Zoznam obrázkov

Obr. 1: Mechanizmus metylácie DNA vrámci CpG ostrovčekov pomocou DNMT[10]	14
Obr. 2: Schéma dvojelektrodového zapojenia[39]	24
Obr. 3: Schéma trojelektrodového zapojenia[39]	24
Obr. 4: Polarogram a schéma zapojenia polarografu[41]	26
Obr. 5: Tvar pôsobiaceho napätia (A) a ukážka priebehu polarizačnej krivky (B)[42]	28
Obr. 6: Priebeh potenciálu a prúdu pri DPV. Potenciál vkladajú na pracovnú elektródu	29
Obr. 7: Všeobecná schéma biosenzoru[44]	30
Obr. 8: Schéma základného princípu PEC bioanalýzy[45]	31
Obr. 9: Blokové schéma modifikácie GCE	36
Obr. 10: Blokové schémy dvoch metód detekcie biosenzorom	38
Obr. 11: Ukážka postupu pri "curve fittingu"	39
Obr. 12: Dvojpík na voltamograme	39
Obr. 13: Signál zmesného roztoku bází v detekčnom okne 0,4 – 1,6 V	40
Obr. 14: Závislosť výšky píkov na depozičnom čase	41
Obr. 15: Závislosť pološírky píkov na depozičnom čase	41
Obr. 17: Závislosť výšky píkov na scan rate	42
Obr. 16: Závislosť pološírky píkov na scan rate	42
Obr. 18: Závislosť výšky píkov na amplitúde	43
Obr. 19: Závislosť pološírky píkov na amplitúde	43
Obr. 20: Kalibračné krivky jednotlivých bází	44
Obr. 21: Porovnanie stability štyroch rovnakých GCE	45
Obr. 22: Voltamogram zmeraného roztoku metylcytozínu a cytozínu	46
Obr. 23: Voltamogram zmeraného roztoku adenínu a metylcytozínu	46
Obr. 24: Voltamogram zmeraného roztoku metylcytozínu a tymínu	47
Obr. 25: Voltamogramy analyzované metódou "curve fitting" pomocou programu MagicPlot	48
Obr. 26: Voltamogram všetkých troch oligonukleotidových sekvencií (nemetylovaná, polovične metylovaná a plne metylovaná)	49
Obr. 27: Postup stanovenia 5-mC pri troch sekvenciách (100µM) – nemetylovaná (A), polovica mC (B) a všetky cytozíny metylované (C)	50
Obr. 28: Postup stanovenia 5-mC pri troch sekvenciách (50µM) – nemetylovaná (A), polovica mC (B) a všetky cytozíny metylované (C)	51
Obr. 29: Porovnanie záznamov bází modifikovanej a nemodifikovanej GCE	53

Zoznam tabuliek

Tab. 1: Štatistika vyplývajúca z kalibračných kriviek	45
Tab. 2: Porovnanie stability elektród na základe výšok píkov	45

1 ÚVOD

Jedným z najvýznamnejších objavov na poli biológie dvadsiateho storočia bolo objavenie dvojzávitnicovej štruktúry DNA Watsonom a Crickom v roku 1953. Tento objav jednak vysvetlil biologickú funkciu DNA a taktiež ovplyvnil smer, ktorým sa biologické vedy začali uberať. Mnoho vedcov sa zaoberalo štúdiom DNA a jej vlastnosťami, pričom využívali rôzne analytické metódy. Už v tridsiatych rokoch sa v štúdiu biologicky aktívnych látok uplatňovala polarografia, ktorá neskôr našla využitie aj pri štúdiu nukleových kyselín. Na konci päťdesiatych a začiatkom šesťdesiatych rokov 20-teho storočia bola publikovaná rada prác, ktoré sa zaoberali elektroaktivitou DNA a ponúkli tak základy pre uplatnenie elektrochemických metód pri jej štúdiu.

Významný posun nastal a nové možnosti otvoril rozvoj epigenetiky na prelome 20-teho storočia. Jedná sa o vedný obor, ktorý sa zaoberá takými modifikáciami, ktoré dedične ovplyvňujú genovú expresiu bez zmeny primárnej genetickej informácie, teda sekvencie nukleotidov v DNA. Medzi tieto modifikácie patrí aj metylácia DNA, ktorá sa významnejšie dostala do povedomia začiatkom osemdesiatych rokov. Jedná sa o epigenetický mechanizmus pri ktorom dochádza k pozmeneniu cytozínovej bázy DNA, bez toho aby sa zmenil jej kódujúci význam. Význam metylácie sa uplatňuje pri kontrole génovej expresie, bunkovej diferenciácii a embryonálnom vývoji. Poruchy v mechanizme metylácie DNA sú úzko spojené aj s tvorbou nádorov. Nesprávna metylácia rozličných oblastí génov môže viesť k aktivácii onkogénov, alebo potlačeniu expresie tumor supresorových génov. Detekcia metylačných zmien v špecifických oblastiach DNA tak môže byť významným nástrojom pre porozumenie nielen molekulárnej patológie v súvislosti so skorou diagnózou rakoviny, ale aj mechanizmov pre epigenetickú reguláciu genetickej informácie. Tradičné metódy pre stanovenie úrovne metylácie sú primárne zamerané na polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) a analýzu na základe bisulfidovej konverzie. Ďalšie pokročilé metódy založené napr. na prenose fluorescenčnej rezonančnej energie, kolorimetrickom teste, alebo elektrochemiluminiscencií síce ponúkajú mnoho výhod, no často vyžadujú finančne nákladné vybavenie a časovo náročnú prípravu DNA. Elektrochemické techniky naopak poskytujú veľkú výhodu rýchlej, vyhovujúcej a presnej analýzy procesu metylácie DNA. Analýza metylácie DNA založená na priamej elektrochemickej oxidácii báz je jednou z najpokročilejších metód, čo sa týka rýchlosti analýzy a taktiež nieje nutné spotrebovať nadmerné množstvo vzorku. Ďalší vývoj a zameranie na túto oblasť preto zaručuje veľký posun v oblasti analýzy epigenetických modifikácií.

2 EPIGENETICKÉ MODIFIKÁCIE

Zmena DNA na základe procesu metylácie patrí medzi tzv. epigenetické modifikácie. Týmito zmenami sa zaoberá epigenetika, ktorú môžeme definovať ako oblasť výskumu skúmajúca dedičné zmeny na chromatinovom templáte, ktoré nesúvisia so zmenou primárnej sekvencie DNA. Typickým rysom epigenetiky sú variabilná expresivita a penetrácia. Miera penetrácie vyjadruje pravdepodobnosť, s akou sa určitý genotyp prejaví vo fenotype, kdežto expresivita je zase daná silou s akou sa určitý genotyp prejavuje vo fenotype. Medzi hlavné epigenetické mechanizmy okrem metylácie DNA patria ešte histónové modifikácie, remodelácia chromatinu a RNA interferencie. Ich funkčným prejavom je napríklad genómový imprinting, inaktivácia chromozómu X, definovanie oblasti centromér, alebo oprava dvojreťazcových zlomov v DNA.

2.1 História

Termín epigenetika je relatívne mladý pojem, ktorý ako prvý definoval britský biológ Conrad H. Waddington v prvej polovici 20. storočia pri skúmaní dedičnosti živočíchov. Zostavil model epigenetickej krajiny, ukazujúci voľbu vývojového rozhodnutia. Jedná sa o hypotetickú krajinu s rôznymi nerovnosťami a prekážkami.

V jej hornej časti je umiestnená loptička, ktorá si vyberá svoj smer podľa členitosti terénu (model enviromentálnych zmien na špecifický osud bunky). Loptička sa môže uberať smerom normálneho fenotypu, alebo cestou alternatívneho fenotypu.[1]

Ďalším známim vedcom, ktorý sa podieľal na rozvoji epigenetiky bol molekulárny biológ Arthur D. Riggs, ktorý sa zaoberal metyláciou DNA. V roku 1975 navrhol hypotézu, že chemické modifikácie DNA ako je metylácia, ovplyvňujú génovú expresiu. Molekulárny biológ Robin Holliday študoval vplyv metylácie DNA na expresiu génov ako u normálnych, tak aj u nádorových buniek. V roku 1987 vydal

článok *The Inheritance of epigenetic defect*, kde sa zaoberal vzťahom regulácie génovej expresie a metylácie cytozínu v DNA.[2]

Po roku 1987 dochádzalo k ďalšiemu a hlavne hlbšiemu zkúmaniu epigenetiky a ich mechanizmov. Podkladom pre ďalší výskum v tomto smere bolo objavenie genového imprintingu v roku 1984. Jedná sa o mechanizmus génovej expresie, pri ktorej sa určité gény exprimujú v závislosti od svojho pôvodu (materský, resp. otcovský). Imprintovaný gén je definovaný skutočnosťou, že je transkribovaný iba z jednej rodičovskej alely. Pôvodne sa predpokladalo, že k normálnemu vývoju je potrebná expresia otcovskej aj materskej alely.

Po roku 1991 však bola táto teória vyvrátená objavom prvých imprintovaných génov. Surani a spol. objavili maternálny imprinting (paternálnu expresiu) u génu *Igf2* a paternálny imprinting (maternálnu expresiu) u génu *Igf2r* a génu *H19*, kódujúceho jednu z najčastejších RNA vyskytujúcej sa u vyvíjajúceho sa myšieho embria.[3]

V roku 2006, Andrew Z. Fire a Craig C. Mello obdržali Nobelovú cenu za fyziológiu a medicínu za objav RNA interferencie. Dokázali u *Caenorhabditis elegans*,

že v DNA môže dochádzať k umlčovaniu génov pomocou dvojvláknového vlákna RNA. Dnes patrí epigenetika k jednému z najrýchlejšie sa rozvíjajúcich oborov v molekulárnej biológii. Jej poznatky sú overované a aplikované v praxi napr. pre potreby prevencie, diagnostiky a terapie v medicíne.[4]

2.2 Metylácia DNA

Metylácia DNA je epigenetický mechanizmus, ktorým dochádza k pozmeneniu cytozínovej bázy DNA be toho, aby sa zmenil jej kódujúci význam. Má represívny charakter a súvisí s chromaínovou prestavbou. Metylácia DNA predstavuje stabilný, no nie ireversibilný signál, ktorý vedie po ustanovení k regulácii génovej expresie s následnými vývojovými a genetickými následkami. Táto kovalentná modifikácia DNA zohráva veľmi podstatnú úlohu v udržovaní kompaktného a umlčaného stavu chromaínu prostredníctvom metyl-DNA väzbových proteínov a histondeacetyláz. Metylácia DNA udržiava stabilitu a integritu genetickej informácie, ktorá spočíva predovšetkým v dlhotrvajúcom umlčaní mobilných a repetitívnych sekvencií DNA. Metylácia DNA je ďalej podstatná pri kontrole génovej expresie, bunkovej diferenciácii a embryonálnom vývoji. Diferenciálna metylácia sa uplatňuje pri ustanovení rodičovského imprintingu a pri stabilizácii inaktivovaného stavu chromozómu X.[5][7]

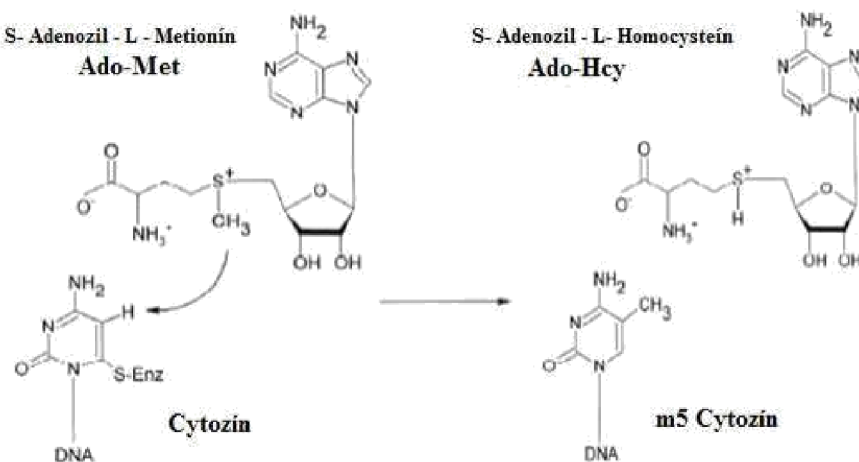
U baktérií je metylácia používaná ako obranný mechanizmus, kde umožňuje rozoznávanie vlastnej metylovanej DNA a cudzej nemetylovanej DNA. Hneď ako je syntetizované nové vlákno, okamžite je metylované. U ľudí je metylácia obmedzená len na modifikáciu cytozínu, vyskytujúceho sa v oblastiach genómu, ktoré obsahujú cytozín-guanín dinukleotidy (CpG). Distribúcia CpG dinukleotidov je v ľudskom genóme asymetrická, pričom všetky z nich sú modifikovateľné metyláciou DNA. Z celkového počtu CpG dinukleotidov je 80% metylovaných. Tieto metylované CpG dinukleotidy sú častými miestami mutačných tranzícií. [6][8][11]

Oblasti so zvýšeným výskytom C-G párov sa nazývajú CpG ostrovy. Obsah C-G párov vrámci CpG ostrovov predstavuje približne 64-67%, kdežto priemerný výskyt činí 41-42%.

Približne 70% exprimovaných ľudských génov je asociovaných s CpG ostrovmi. Sekvencia CpG ostrovu presahuje do oblasti transkripčných štartov, kde sú rozpoznávané transkripčnými faktormi a zohrávajú regulačnú funkciu. CpG ostrovy sú dôležité v ochrane udržovacích génov pred *de novo* metyláciou a udržujú ich transkripčne aktívny stav.[11][12]

2.2.1 Mechanizmus DNA metylácie

Bunky počas diferenciácie a vývoja prekonávajú významné morfológické a funkčné zmeny bez toho, aby došlo k zmene v primárnej štruktúre DNA. Tieto zmeny sú dôsledkom génovej expresie na epigenetickej úrovni. Génová aktivita, alebo naopak represia koreluje s mierou metylácie DNA promotorových oblastí. Metylácia DNA je katalyzovaná enzýmami, ktoré sa nazývajú metyltransferázy (DNMT). Tie kovalentne modifikujú uhlík cytozínovej bázy v pozícií 5 vrámci CpG ostrovčekov za vzniku 5 - metylcytozínu (m^5C). Metylácia DNA môže taktiež prebiehať na pozícií N6 adenínu a N4 cytozínu, no jediná modifikovaná báza, ktorá sa vo väčšej miere objavuje vo vyšších eukaryot je práve m^5C . Pri metylácií dochádza k rozpoznaní substrátových molekúl prostredníctvom DNMT spolu s pomocnými kofaktormi. Nukleofilným napadnutím SH skupinou cysteínu katalytického motívu sa utvorí kovalentný komplex medzi bázou a enzýmom. Cytozínová báza sa v priebehu nukleofilného napadnutia vytočí zo štruktúry DNA helixu do katalytického miesta DNMT. To spôsobí zrušenie vodíkových mostíkov, ako aj ďalších interakcií medzi aromatickými kruhmi vo vnútri DNA helixu. Uhlík v pozícií 5 cytozínovej bázy sa stane aktivovaným a schopným k nukleofilnému napadnutiu metylovej skupiny Adenozil-L-methionínu. Deprotonáciou v C5 pozícií dochádza k eliminácii cysteínovej skupiny a k obnoveniu aromatickosti. Metyláciou DNA dochádza k pozmeneniu vzhľadu veľkého žliabku DNA, ktoré ale stéricky neinterferuje s normálnym Watson - Crickovým párovaním. Takto ustanovené epigenetické značky DNA sú dedičné.[9]



Obr. 1: Mechanizmus metylácie DNA vrámci CpG ostrovčekov pomocou DNMT[10]

2.2.2 DNA metyltransferázy

Ako už bolo spomenuté, substrátom metylovej skupiny je S-adenozyl-L-metionín. Prenos metylovej skupiny na CpG dinukleotidy je katalyzovaný DNA metyltransferázami, ktoré tak prispievajú k tvorbe hemimetylovanej (metylácie iba jedného vlákna) alebo plne metylovanej DNA. Momentálne sú známe tri aktívne DNA metyltransferázy, ktorými sú udržiavajúca DNMT1, a *de novo* metyltransferázy DNMT3a a DNMT3b. Spoločne tieto enzýmy môžu vytvárať nové metylačné vzory a udržiavať ich vďaka bunčnému deleniu. Preto tvoria základ stabilnej epigenetickej transkripčnej pamäti.[13][15]

DNMT1 je známa, ako udržovacia metyltransferáza, ktorá sa primárne podieľa na udržovaní, zachovaní a rozširovaní už existujúcich metylačných vzorov, počas každého bunkového cyklu. DNMT1 metyluje zostatky CpG a prednostne hemimetylovanú DNA, ku ktorej má veľkú afinitu. Pri replikácií udržiava metylačný profil v novo syntetizovanom reťazci, ktorý je nevyhnutný pre epigenetickú dedičnosť. V menšej miere je zodpovedná za *de novo* metyláciu tumor supresorových génov. DNMT1 je najväčšia metyltransferáza s molekulárnou hmotnosťou 184 kDa.[13][14]

Enzýmy DNMT3a a DNMT3b udržiavajú *de novo* metylačnú aktivitu a sú zodpovedné za metyláciu, ktorá sa vyskytuje počas embryogenézie. Chyby v génoch pre DNMTs môžu mať fatálne následky. Mutácia v géne pre DNMT3b spôsobuje imunodeficienciu. ICF (Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies syndrome) syndróm je stav, pri ktorom je porušená niektorá zo zložiek imunitného systému, a to v zmysle jej chýbania, zníženia, alebo alterácie.[13][16][17]

2.2.3 Demetylácia

Demetylácia je dej, pri ktorej dochádza k odstráneniu metylovej skupiny z 5-metylcytozínu. Tento proces môže prebiehať buď pasívne, po replikácií nie je nový reťazec metylovaný, alebo aktívne, nezávisle na replikácií. Pasívny proces môže byť napr. liečba pomocou 5-azacytidínu u myelodysplastického syndrómu. Jedná sa o chemický analóg cytidínu, ktorý sa inkorporuje do DNA, alebo RNA, kde pôsobí ako hypometylačné činidlo. Znižuje metyláciu promotorov, redukuje proliferáciu buniek a signifikantne znižuje rast nádoru v IDH1 mutantnom gliome.[18]

2.2.4 Poruchy metylácie

Metylácia DNA hrá významnú úlohu vo vývoji a správnom fungovaní organizmov. Uzko súvisí s expresiou génov, napr. prítomnosť metylácie v promotorovej oblasti má vo väčšine prípadov za následok umlčanie exprese daného génu. Metylované cytozíny nachádzame aj v transkribovaných oblastiach génov. Táto modifikácia ovplyvňuje expresiu prevažne na posttranskripčnej úrovni.[19]

Metylácia DNA hrá významnú úlohu vo vývoji a správnom fungovaní organizmov. Uzko súvisí s expresiou génov, napr. prítomnosť metylácie v promotorovej oblasti má vo väčšine prípadov za následok umlčanie exprese daného génu. Metylované cytozíny nachádzame aj v transkribovaných oblastiach génov. Táto modifikácia ovplyvňuje expresiu prevažne na posttranskripčnej úrovni.[19]

Zmena v hladine metylovaných cytozínov má za následok početné fenotypové prejavy, čo bolo študované prevažne u rastlín. U človeka je známa rada chorôb súvisiacich s poruchami metylácie DNA. Rettov syndróm je ťažkým syndrómom mentálnej retardácie žien. Jeho príčinou je mutácia v géne MECP2 kódujúci 5-metylcytozín – väzbový proteín. Proteín sa viaže na silne metylované oblasti genómu a je súčasťou proteínového komplexu, ktorý spôsobuje ich transkripčnú inaktivitu. Ďalšou chorobou, vedúcou k detskej úmrtnosti je už spomínaný ICF syndróm, ktorý vzniká mutáciou génu DNMT3b. Typickým príznakom je znížená produkcia imunoglobulínu, čo v konečnom dôsledku vedie k zníženiu imunity a infekčným chorobám.[20][21]

S hypermetyláciou, či hypometyláciou je úzko spojená aj tvorba nádorov. Nesprávna metylácia promotorov a transkripčných oblastí génov môže viesť k aktivácií onkogénov, alebo potlačeniu exprese tumor supresorových génov. Hypermetylácia potlačuje transkripciu promotorových oblastí génov bohatých na výskyt CpG ostrovčekov vedúcich k inhibícii ich transkripcie. Táto modifikácia umlčuje mnoho klasických funkcií tumor supresorových génov, vrátane hormonálnej signalizácie, opráv DNA, bunkovej adhézie, kontroly bunkového cyklu a apoptózy. Približne 1% ľudskej

DNA pozostáva z krátkych CpG ostrovčekov. V nemetylovannej forme môže byť chromatín v týchto oblastiach formovaný do aktívnej štruktúry, ktorá uľahčuje naviazanie RNA polymeráz do oblasti promotoru génu. Metylované CpG dinukleotidy spôsobujú spontánnu deamináciu 5-metylcytozínu na thymín. Táto reakcia spôsobí zmenu štruktúry chromatínu, čo v konečnom dôsledku vedie k významnej bariére transkripcie. CpG ostrovčeky sú v promotorových oblastiach normálnych tkanív väčšinou nemetylované bez ohľadu na transkripčnú aktivitu génu.

Výnimkou sú netranskribované gény na inaktívnom chromozóme X a imprintované autozomálne gény, kde jedna z rodičovských alel môže byť metylovaná.[20][21]

Hypometylácia je druhou metylačnou chybou, ktorá je pozorovaná v rôznych zhubých nádoroch vrátane rakoviny prostaty. Je pravdepodobné, že hypermetylačné zmeny predchádzajú zmenám hypometylačným, ktoré sú všeobecne detekované v rakovinách vyššieho štádia. Hypometylácia je pozorovaná v dôsledku zníženej metylácie hojných repetitívnych sekvencií, ktoré sú husto metylované v normálnych bunkách, ako sú LINE -1 retrotranspozóny. Predpokladá sa, že prispieva k onkogenéze skrz rozmanité mechanizmy vrátane aktivácie onkogénov, aktivácie latentných retrotranspozónov a prispieva k nestabilite chromozómov. Hypometylácia DNA je spojená so zvýšenou genomickou nestabilitou. Detekcia metylačných zmien v špecifických oblastiach DNA tak môže byť jedným z indikátorov nádorových ochorení.[20][21]

2.3 Inhibícia metylácie DNA

Inhibícia metylácie je jedným z prístupov štúdia metylácie DNA. Tieto prístupy sú založené na inhibícií DNA – metyltransferáz, pričom daný proces môžeme uskutočniť na dvoch úrovniach, biochemickej a genetickej.[20]

Proces biochemickej inhibície je založený na ovplyvnení väzby metyltransferáz k DNA, poprípade ich aktivity. Ku klasickým hypometylačným činidlám sa riadi 5-azaC a 5-aza-dC. Tieto látky sú schopné inkorporácie do DNA, kde vytvárajú kovalentnú väzbu s udržovacou a *de novo* metyltransferázami, čím bráni ich ďalšej katalytickej aktivite. Obe látky patria k ireversibilným inhibítorm, no ich veľkou nevýhodou je pomerne vysoká toxicita a nestabilita vo vodných roztokoch, na základe čoho sú nevhodné pre dlhodobé experimenty. [22][23]

Inhibícia DNA na genetickej úrovni prebieha za pomoci využitia mutantných organizmov. V tomto prípade sa do študovaného génu vkladá cudzorodá DNA, čím dôjde k jeho inaktivácii.[22]

3 ANALYTICKÉ METÓDY

Nakoľko existuje viacero metód pre detekciu metylácie DNA, je takisto potrebné voliť správny prístup pre konkrétnu analýzu. Sekvenčne špecifické metódy ponúkajú informáciu o metylácií konkrétne lokalizovaného cytozínu. Sem patria metódy založené na modifikácií DNA bisulfidom a metódy, ktoré využívajú metylačne citlivé restriktčné endonukleázy. Sekvenčne nešpecifické metódy na druhej strane poskytujú informácie o celkovej hladine metylácie DNA.

3.1 Metylačne citlivé restriktčné endonukleázy

Restriktčné endonukleázy sú enzýmy, ktoré štiepia dvojšróbovicu DNA v špecifických oblastiach sekvencie, ktoré sa nazývajú restriktčné miesta. S využitím restriktčných endonukleáz, ktoré sú citlivé na metyláciu získame informáciu o hladine metylácie v danom restriktčnom motive. Nevýhodou metódy je neistota úplného naštiepenia DNA a zistenie relatívnej metylácie len cytozínov, ktoré sa nachádzajú v restriktčnom mieste. Okrem toho je nevyhnutné, aby sa v študovanej oblasti vôbec nachádzali miesta pre štiepenie metylačne citlivou restriktčnou endonukleázou.[24]

Často používaným isoschizomerickým párom restriktáz sú EcoRII a BstNI.

Izoschizomerické páry sa vyznačujú rovnakým restriktčným miestom. Tieto enzýmy štiepia DNA v sekvencií CCWGG, kde W reprezentuje adenín, alebo tymín. BstNI štiepi celovú sekvenciu bezohľadu na to, či je, alebo nie je metylovaná, kdežto EcoRII rozštiepi DNA len vtedy, pokiaľ motív CCWGG nie je modifikovaný metyláciou na vnútornom cytozíne. Ďalším častopoužívaným isoschizomerickým párom sú enzýmy HpaII a MspI. Ich štiepiace miesto je v motíve CCGG. MspI štiepi DNA, pokiaľ nie je vonkajší cytozín metylovaný a HpaII naštiepi DNA v prípade prítomnosti metylácie na ktoromkoľvek cytozíne. Mieru metylácie DNA po štiepení v danej sekvencií je možné zistiť elektroforetickou separáciou naštiepenej DNA, Southernovým prenosom na nylonovú membránu a hybridizáciou s rádioaktívne, alebo fluorescenčne značenou sondou. Ako sonda sa používa úsek DNA, ktorého metyláciu sledujeme.[24][26]

Existuje rada ďalších spôsobov, ako detekovať mieru metylácie po použití metylačne citlivých endonukleáz. DNA môže byť vystavená pôsobeniu metylačne citlivého enzýmu, ktorý ju štiepi len v nemetylovaných oblastiach. Následne je táto pasáž štiepena metylačne necitlivým isoschizomérom. Príkladom je štiepenie metylačne citlivým enzýmom SmaI a následné štiepenie metylačne necitlivým XmaI.

V tejto analýze je kľúčová skutočnosť, že po štiepení enzýmom SmaI vznikajú restriktčné fragmenty s tupými koncami, zatiaľčo XmaI zanecháva po štiepení konce kohézne, tzv. lepidlo. Ku kohéznym koncom sú ligované adaptory a je prevedená špecifická amplifikácia týchto oblastí pomocou PCR. V PCR sú teda pomnožené len metylované oblasti a následne sa využíva metóda DNA microarray, kde sú produkty PCR hybridizované k potenciálnym cieľovým sekvenciám, ktoré sú kovalentne viazané na mikroskopických DNA čipoch.[26][27]

3.2 Modifikácia bisulfidom

Táto metóda je založená na odlišnej reakcii cytozínu a metylcytozínu s bisulfidom. Cytozín je behom reakcie hydrolyticky deaminovaný na uracil. 5 - metylcytozín oproti tomu nieje schopný reakcie s bisulfidom, nakoľko jeho metylová skupina na piatom uhlíku stericke bráni jeho prístupu. Reakcia prebieha na jednovláknovej DNA, preto je nevyhnutná denaturácia. Na to, aby bola analýza metylácie DNA úspešná je nutné čo najväčšie percento konverzie nemetylovaných cytozínov na uracily. Táto premena spravidla nikdy nieje úplná, avšak pri zaistení správnych podmienok reakcie môže byť až 99%. Medzi tieto podmienky sa radia vysoká koncentrácia bisulfidu, dostatočne nízke pH a opakovaná denaturácia templátu.[24]

Na konvertovanej DNA následne prebieha amplifikácia analyzovanej oblasti. Je dôležité si uvedomiť, že konvertované vlákna DNA už niesú komplementárne a preto je nutné amplifikovať a študovať každé vlákno zvlášť. V PCR sa do vlákna DNA radí thymín na miesto uracilu a cytozín na miesto jeho metylovanej formy. Kritickým bodom analýzy je návrh primerov, ktoré musia byť schopné nasadať ako na vlákno, v ktorom boli pred modifikáciou metylované cytozíny, tak aj na pôvodné nemetylované vlákno.[24]

3.2.1 Priame bisulfidové skenovanie

Táto metóda poskytuje informáciu o metylácií všetkých cytozínov v úseku DNA, ktorý je predmetom analýzy. Po bisulfidovej modifikácii a amplifikácii DNA sú produkty PCR vkladané do plazmidových vektorov a následne sekvenované Sangerovou metódou. Nevýhodou tejto techniky je časová náročnosť, poskytuje však presnú metylačnú mapu danej časti DNA.[24]

3.2.2 Bisulfidové pyrosekvenovanie

Rovnako aj táto metóda je založená na konverzii DNA bisulfidom a následnom PCR. Ďalší postup sa zakladá na enzymatickej syntéze reťazca homológneho k analyzovanej jednovláknovej DNA, ktorá je špecifickým spôsobom imobilizovaná.

K tejto DNA sú postupne pridávané jednotlivé deoxynukleotidtrifosfáty. V reakčnej zmesi je vždy prítomný len jeden z nukleotidov. Akonáhle dôjde k zaradeniu komplementárneho nukleotidu, uvoľní sa pyrofosfát a následne sa vyžiari svetelné kvantum, ktoré je snímané. Tento jav sa nazýva luciferázová reakcia. Celkovo je v reakčnej zmesi prítomných viacero enzýmov. DNA polymeráza syntetizuje komplementárne vlákno, podľa imobilizovaného jednovláknového templátu. Pri tejto reakcii dochádza k uvoľneniu pyrofosfátu. ATP sulfuryláza následne v prítomnosti adenosinfosfosulfátu konvertuje pyrofosfát na ATP. To je využité luciferázou k oxidácií luciferinu, behom čoho dochádza k uvoľneniu svetelného kvanta. Na záver sú nevyužité nukleotidy degradované enzýmom apyrázou, aby mohli do reakčnej zmesi vstupovať iné nukleotidy. Pyrosekvenovanie poskytuje relatívne presné dáta o metylácií jednotlivých cytozínov, nevýhodou je však práca s krátkymi sekvenciami (~100 bp).[25][28]

3.3 COBRA

COBRA je skratka pre kvantitatívnu metódu metylačnej analýzy DNA. Bisulfidom modifikovaná a amplifikovaná DNA je štiepená metylačne citlivými restriktívnymi enzýmami. Produkty štiepenia sú separované gélovou elektroforézou. Stupeň metylácie daného úseku koreluje s množstvom naštiepených a nenaštiepených úsekov, teda s dĺžkou fragmentu DNA. Naštiepenie DNA endonukleázami nemusí byť úplne, čo môže viesť k podhodnoteniu skutočného stupňa metylácie.[24]

3.4 Vysokoúčinná separácia

Skupinou sekvenčne nešpecifických metód analýzy DNA sú vysokoúčinné separácie. Medzi tento typ metód sa radia kvapalinová chromatografia a kapilárna elektroforéza.

3.4.1 HPLC

Vysokotlaká kvapalinová chromatografia je kvantitatívnou metódou, pomocou ktorej sa stanovuje celkové množstvo metylovaných cytozínov v genóme. Genómová DNA podlieha chemickej hydrolýze, ktorej produkty sú od seba oddelené práve pomocou HPLC. DNA je radou enzýmov naštiepená na jednotlivé deoxyribonukleosidy, ktoré sú pomocou chromatografie separované. Následne je stupeň metylácie cytozínu určený zrovnaním hodnôt absorpcie metylcytozínu a cytozínu v analyzovanej vzorke a v štandarte o známom obsahu týchto bázií. Väčšiu citlivosť je možné dosiahnuť použitím hmotnostnej spektrometrie namiesto spektrofotometrického merania.

Nevýhodou metódy je, že vyžaduje veľké množstvo genómovej DNA o vysokej kvalite a pomerne veľké finančné nároky na techniku.[24][25]

3.4.2 HPCE

Oproti HPLC je vysokoúčinná kapilárna elektroforéza rýchlejšia a o niečo citlivejšia metóda. HPCE funguje na podobnom princípe, ako HPLC. Genómová DNA je v prvom kroku hydrolyticky štiepená a následné produkty sú v ďalšom kroku od seba oddelené kapilárnou elektroforézou. K zvýšeniu citlivosti je možné použiť laserom indukovaný fluorescenčný detektor a hmotnostnú spektrometriu.[24]

3.5 Imunoprecipitácia

Imunoprecipitácia je kvantitatívna metóda, ktorá zisťuje stupeň metylácie na danom úseku DNA. Môže byť dokonca prevedená aj in situ, teda na bunkách. V roku 1985 bolo zistené, že na 5-metylcytozín v dsDNA sa viažu špecifické protilátky. Nasleduje detekcia pomocou sekundárnej protilátky nesúcej fluorescenčnú značku a podľa miery fluorescencie sa následne určí stupeň metylácie. Nameraná fluorescencia je zrovnávaná s hodnotami žiarenia buniek o známom stupni metylácie.[24]

3.6 „High – through sekvenovanie“

Tradičná metóda sekvenovania genómov rôznych organizmov zahrňuje zdĺhavé Sangerovo sekvenovanie, ktoré je jednak časovo náročné. Okrem toho je potrebné využitie množstva prístrojov a taktiež väčšieho množstva genómovej DNA. Pri novšom prístupe high throughput sekvenovania nieje potrebné také veľké množstvo, pričom jeho najväčšou výhodou je rýchlosť. V niektorých prípadoch je však klasické Sangerovo sekvenovanie obtiažne nahradiť, napr. pokiaľ genóm obsahuje mnoho repetitívnych sekvencií.[29]

Bisulfidová konverzia DNA a analýza amplifikovaných sekvencií je technika celogenómového sekvenovania, na základe tzv. „next generation sequencing“. Nazýva sa BS-Seq a pomocou nej je možné detekovať metyláciu v miestach, ktoré boli pred tým považované za nemetylované, čím sa významným spôsobom zvýšila citlivosť detekci oproti metóde založenej na „DNA microarray“. Tieto metódy využívajú hybridizáciu analyzovanej sekvencie k tisícim cieľovým sekvenciám, ktoré sú imobilizované na mikroskopických doštičkách.[29]

4 ELEKTROCHÉMIA

Elektrochémia skúma procesy, ktoré prebiehajú na rozhraní elektród a elektrolytu, medzi ktorými dochádza k prenosu elektrického náboja. Táto výmena je spôsobená redoxnou reakcou, ktorá je označovaná ako elektródový dej. Jeho princíp opisuje nasledujúci jednoduchý príklad.[30]

Ponorením strieborného pliešku do roztoku AgNO_3 dôjde k vzniku striebornej elektródy. Katióny striebra sa v dôsledku odoberania elektrónov z pliešku vylučujú ako neutrálne častice do doby, než dôjde k ustálenému stavu. Pliešok sa voči roztoku nabíja kladne. Rozdiel potenciálu kovu a roztoku predstavuje rovnovážne napätie elektródy. Na potenciálovej stupnici nie je presne daný počiatok, preto bol na základe dohody prisúdený nulový potenciál elektróde vodíkovej. Potenciály ostatných elektród sa určujú porovnávaním so štandardnou vodíkovou elektródou. Potenciál je možné vypočítať pomocou Nernstovej rovnice. Tá popisuje závislosť potenciálu elektródy na koncentrácií iontov v roztoku, ale len v prípade, že elektródou neprechádza prúd.[30]

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} - \ln \frac{a_{red}}{a_{ox}}$$

kde

E = elektródový potenciál [V],

E^0 = štandardný elektródový potenciál [V],

R = molárna plynová konštanta ($8,314 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$),

T = termodynamická teplota [K]

n = počet vymenených elektrónov [-],

F = Faradayova konštanta ($96485,3365 \text{ C.mol}^{-1}$),

a = aktivita oxidovanej/redukovanej formy

V prípade, že elektródou prechádza prúd, jej potenciál môže nabrať iné hodnoty oproti rovnovážnej, čím dochádza k polarizácií. Tú spôsobuje redoxný dej. Jedná sa o reakciu, pri ktorej dochádza k zmene oxidačného čísla častíc. V prípade oxidácie dochádza k zvyšovaniu oxidačného čísla, pri redukcii je tomu naopak. Tieto deje spôsobujú oxidačné, resp. redukčné činidlá. Oxidačné činidlá oxidujú inú látku, pričom sa prijímajú elektrónov samé redukujú. Redukčné činidlá spôsobujú presne opačnú reakciu. Oxidácia a redukcia musia prebiehať súčasne.[30][31]

4.1 Rozdelenie elektród

Elektródy prvého typu sú tvorené elektródou ponorenou do roztoku vlastných iónov. Patria sem kovové a plynové elektródy, ako sú napr. elektródy strieborné, medené, zinkové, olovené, alebo vodíkové.[32]

Pri elektródach druhého typu existujú dve fázové rozhrania. Medzi roztokom a kovom elektródy sa nachádza málo rozpustná soľ, ktorá je tvorená kationom kovu, roztok naopak obsahuje anión soli. Príkladom je argentchloridová (AgCl), alebo kalomerová Hg_2Cl_2 elektróda. [32]

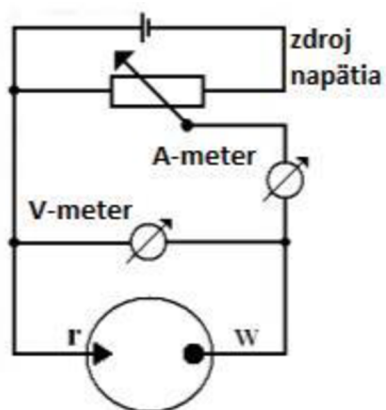
Oxidačno redukčné elektródy sú tvorené obvykle ušlachtilým kovom ponoreným do roztoku oxidovanej a redukovanej formy oxidačne redukčného systému. Kov sa chemickej reakcie nezúčastňuje a plní len funkciu kontaktu a transportu elektrónov. Oxidová forma prijíma elektróny a dochádza k jej redukcii, naopak redukovaná forma elektróny odovzdáva, čím dochádza k jej oxidácii.[32]

Ďalším typom sú iontovo selektívne elektródy, ktoré sa skladajú z iontovo selektívnej membrány, vnútorného elektrolytu a vnútornej referenčnej elektródy. Medzi membránou a roztokom vzniká tzv. Donnanov potenciál. Výsledný potenciál membrány je následne daný rozdielom oboch Donnanových potenciálov (na každej strane membrány jeden).[32]

4.2 Elektródové systémy

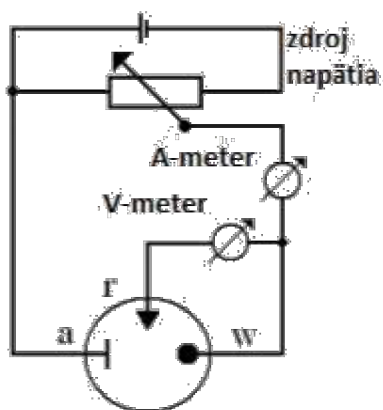
Elektródové systémy sa delia podľa usporiadania resp. počtu elektród, ktoré sa podieľajú na meraní. Môže sa jednať o zapojenie dvojelektródové, trojelektródové, prípadne aj štvorelektródové.[33]

Najjednoduchší typ zapojenia je dvojelektródový systém s jednou pracovnou (WE) a jednou referenčnou elektródou (RE). Vložené napätie je medzi týmito elektródami merané pomocou voltmetru a prúd pomocou ampérmetru. Pri zmene vloženého napätia dochádza k zmene potenciálu pracovnej elektródy, pričom potenciál referenčnej je nemenný. Značnou nevýhodou tohto zapojenia je, že nieje možné presne stanoviť potenciál pracovnej elektródy, kvôli úbytku napätia spôsobeného odporom roztoku. Kvôli tejto skutočnosti je takýto systém zapojenia pomerne nepresný.[33]



Obr. 2: Schéma dvojelektrodového zapojenia[39]

Oproti dvojelektrodovému zapojeniu poskytuje trojelektrodový systém výhodu v tom, že nedochádza k úbytku napätia spôsobeného odporom roztoku. Napätie je merané medzi elektródou pracovnou a referenčnou. Medzi týmito elektródami nepreteká elektrický prúd, preto je hodnota meraného napätia presná. Ten sa meria medzi pracovnou a pomocnou elektródou. Trojelektrodový systém je v elektrochémii využívaný najčastejšie.[33]



Obr. 3: Schéma trojelektrodového zapojenia[39]

4.2.1 Pracovná elektróda

Jedná sa o polarizovateľnú, oxidačno-redukčnú elektródu, ktorej dôležitou vlastnosťou je elektrochemická stabilita pre veľký potenciálový rozsah. Preto sa obvykle vyrába s materiálov, ako je zlato, ortuť (kvapalná elektróda), alebo uhlík. Pracovná elektróda musí mať presne definovaný tvar a veľkosť povrchu, pretože pretekajúci prúd je priamo úmerný veľkosti jej povrchu. Vo voltametrií sa používajú pracovné elektródy z tuhých materiálov. Ich povrch sa neobnovuje, je stále viac opotrebený, prípadne zanesený nečistotami. Táto skutočnosť spôsobuje rozdielnosť nameraných hodnôt prúdu pri niekoľkonásobne opakovanom meraní. Rozdielnosť hodnôt sa dá minimalizovať dôkladným čistením povrchu elektródy pred každým meraním. Výhodou tuhých elektród je, že na rozdiel od elektródy ortuťovej sú použiteľné aj pre meranie kladných potenciálov. Ďalšou výhodou je možnosť ich miniaturizácie pre senzorové aplikácie.[34]

4.2.2 Referenčná elektróda

Obvykle ide o elektródu druhého typu (napr. kalomerová, alebo argentchloridová), voči ktorej sa vzťahuje potenciál pracovnej elektródy. Referenčná elektróda je nepolarizovateľná a má konštantný elektrochemický potenciál, pretože ňou nepreteká prúd.[34]

4.2.3 Pomocná elektróda

Pomocná elektróda sa využíva len pri tri a viacelektrodových systémoch. Ich úlohou je odvádzať prúd z referenčnej elektródy a tak zabrániť zmene jej zloženia. Vzhľadom k tomu, že elektródou tečie veľký prúd, je dôležitá jej konštantnosť a odolnosť. Vyrábajú sa preto z inertného materiálu, ako je napr. uhlík, alebo platina, s veľkosťou povrchu zrovnateľnou, alebo väčšou, ako je povrch elektródy pracovnej. [34]

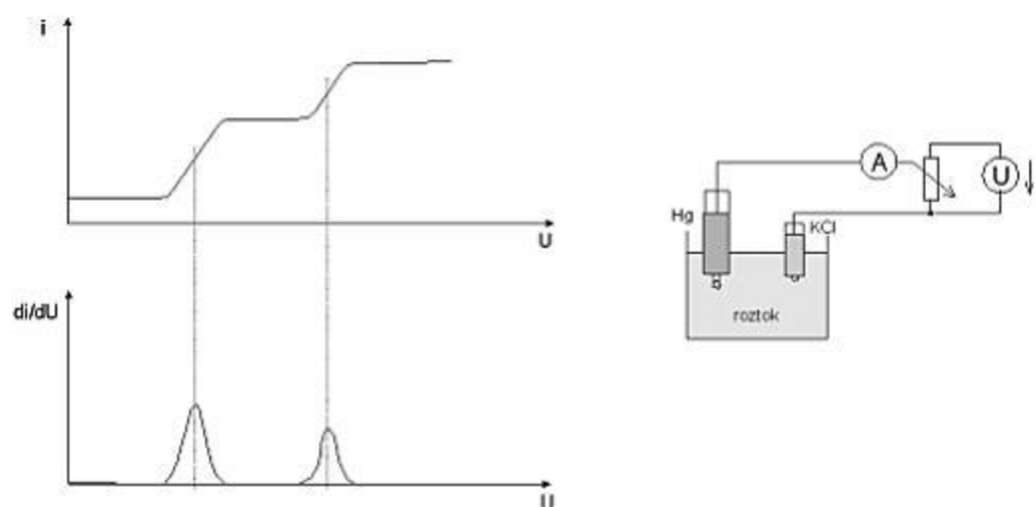
4.3 Priame elektrochemické metódy

Elektrochémiá DNA sa začala vyvíjať v polovici 50. rokov 20. storočia, kedy sa potvrdili elektrochemické vlastnosti nukleových kyselín (NK) pomocou oscilografickej polarografie. Dnes je už známym faktom, že NK sú elektrochemicky aktívne a ich vlastnosti je možné analyzovať prostredníctvom prúdových, alebo iných signálov, ktoré vznikajú po ich interakciách s elektricky nabitými povrchmi. Informácie o vlastnostiach a štruktúre NK sa získavajú v rôznych prostrediach (elektrolytoch) a na materiálovo odlišných elektródach.[40]

Vlastný princíp elektrochémie NK spočíva v tom, že meraná molekula je schopná prijať elektróny od pracovnej elektródy, alebo jej elektróny odovzdávať. V prvom prípade hovoríme o jej redukcii, v druhom zase o oxidácii. Elektroaktívnou zložkou NK sú dusikaté bázy, z ktorých sú redukovateľné adenín, cytozín a guanín a oxidovateľné adenín s guanínom. Redukciu adenínu a cytozínu je možné uskutočniť v neutrálnom, alebo mierne kyslom prostredí na ortuťovej, alebo amalgánovej elektróde. Pri iných typoch dochádza k vyvýjaniu vodíka, ktorý znemožňuje pozorovanie redukčných signálov. Na druhej strane oxidáciu purinových báz, ktorá prebieha pri vysoko pozitívnych potenciáloch okolo +1 V je možné merať na uhlíkových elektródach, ktoré sú v danej potenciálovej oblasti inertné. K analýze metylácie DNA sa používajú rôzne metódy, ktoré sú popísané v nasledujúcej kapitole.[40]

4.3.1 Polarografia

Touto metódou je vyhodnocovaná závislosť elektrického prúdu na napätí, ktoré je privádzané na dvojicu elektródponorených do elektrolytického roztoku. Pracovná elektróda je tvorená ortuťou, kontinuálne sa obnovujúcou kvapkou a druhá referenčná elektróda môže byť napríklad kalomerová, alebo argentchloridová. Výsledkom je polarogram zobrazujúci prúdovú závislosť na priloženom napätí. Na polarograme sa vytvárajú tzv. polarografické vlny. Pomocou ich polohy je možné určiť, o aký typ skúmanej látky sa jedná. Z veľkosti prúdového nárastu je ďalej možné určiť koncentráciu stanovenej látky. Pre jednoduchšie a presnejšie určenie hodnôt je možné využiť krivku vzniknutú deriváciou podľa napätia, z ktorej sú viditeľnejšie predovšetkým prúdové nárasty detekovaných látok. Výhodou polarografie je predovšetkým to, že dochádza k neustálemu obnovovaniu ortuťovej kvapky a tak má stále čistý povrch, čím je zabezpečená spoľahlivá reprodukovateľnosť merania. [41]



Obr. 4: Polarogram a schéma zapojenia polarografu[41]

4.3.2 Voltametria

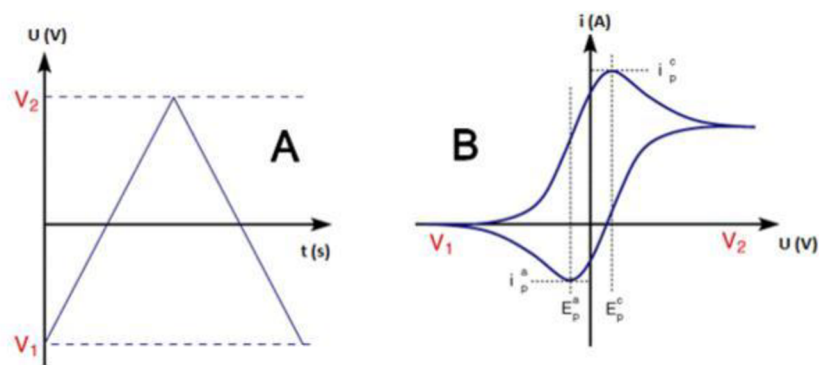
Voltametria je jednou z najpoužívanejších elektrochemických metód vhodných k určovaniu prítomnosti a koncentrácie rôznych analytov, vrátane metylovanej DNA. Voltametria je podobne, ako staršia polarografia založená na meraní polarizačných kriviek. Meranie obvykle prebieha v elektrochemickej cele s elektrolytom v klasickom trojelektrodovom zapojení. Referenčná elektróda je zapojená tak, že ňou pri meraní neprechádza prúd a nedochádza tak k jej polarizácii za týchto podmienok si referenčná elektróda udržiava konštantný potenciál. Behom merania sa lineárne mení elektrický potenciál pracovnej elektródy voči referenčnej a zaznamenáva sa prúd pretekajúci medzi pracovnou a pomocnou elektródou. Pri voltametrickej analýze sa spravidla polarizuje elektróda v oboch smeroch, od kladných k záporným potenciálom a naopak, a v roztoku tak dochádza k oxidačne redukčným reakciám. Výsledkom merania je voltamogram s charakteristickými píkmi.[35]

Každá molekula sa po priechode prúdu vyznačuje špecifickým píkom na voltamograme. Podľa charakteristického potenciálu, v ktorom sa pík na voltamograme nachádza, je následne možné určiť danú látku. Výška píku je naopak referenciou koncentrácie látky, resp. množstva molekúl, ktoré podľahli elektrochemickej reakcii.[35]

4.3.3 Cyklická voltametria

Cyklická voltametria (CV) je metóda založená na postupnom zvyšovaní napätia pracovnej elektródy v čase a meraní prúdu pretekajúceho systémom. Pokiaľ začne pri určitom napätí prebiehať elektrochemická reakcia, dôjde k výraznému zvýšeniu prúdu v systéme. V nameranom grafe sa to prejaví ako charakteristický nárast a pokles prúdu. Správne nastavenie systému závisí na type analyzovanej hmoty tak, aby meranie prebehlo v akceptovateľnom časovom horizonte, pri napätiach odpovedajúcich pracovným napätiam elektródy a s potrebnou vypovedajúcou hodnotou.[36]

Pri CV je skúmaný roztok podrobený potenciálu vloženému na elektródy nasledujúcim spôsobom. Potenciál je lineárne zvyšovaný od počiatočného (initial) k tzv. zlomovému (vertex) potenciálu, čo je tzv. dopredný (forward) scan. Následne je znižovaný ku konečnému (final) potenciálu – spätný (reverse) scan. Počiatočný potenciál je spravidla zhodný s konečným potenciálom, dopredná a spätná scan tak tvoria jeden cyklus. Podľa potreby sa uskutočňuje jeden, alebo viac cyklov. Pokiaľ je technika obmedzená len na polovicu cyklu, hovoríme o lineárnej voltametrii (LSV). Rýchlosť, s akou je potenciál menený (scan rate), určuje časové okno experimentu. Výsledkom CV merania je závislosť prúdu pretekajúceho sústavou na vloženom napätí, tzv. voltamogram. Moderné prístroje pre premeranie voltamogramov, potenciostaty, používajú trojelektrodové zapojenie.[36]

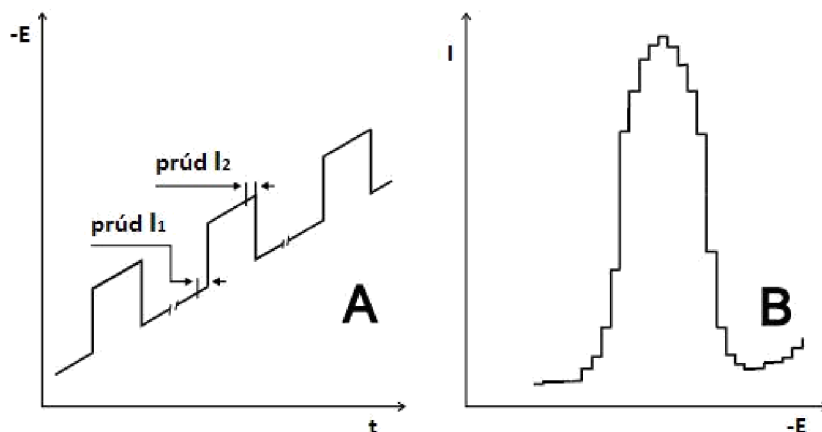


Obr. 5: Tvar pôsobiacého napätia (A) a ukážka priebehu polarizačnej krivky (B)[42]

Roztok vhodný pre voltametrickú analýzu musí obsahovať okrem analytu ešte nadbytok pomocného elektrolytu. Koncentrácia elektrolytu by mala byť taká, aby iontová sila skúmanej látky tvorila maximálne 3% z celkovej iontovej sily roztoku. Iontová sila je veličina vyjadrujúca celkovú „koncentráciu náboja“ v roztoku. Pri práci s pevnými elektródami je potrebné povrch elektródy pred každým scanom vyleštiť pomocou vhodnej pasty. Pozícia píku charakterizuje látku kvalitatívne, zatiaľ čo jeho výška (prúd) je priamo úmerná koncentrácií látky v roztoku a je ju možné využiť ku kvantitatívnemu stanoveniu. Vplyvom mikroskopickej nerovnosti povrchu elektródy sa môže plocha stanovená voltametricky značne odlišovať od geometrickej plochy. CV je charakterizovaná plynulým nárastom potenciálu pracovnej elektródy z jednej meznej hodnoty do druhej a späť do východzieho bodu. Z toho vyplýva, že základnými nastaviteľnými parametrami sú mez a rýchlosť posunu potenciálu. Ovlpyvňovať je taktiež možné vlastnosti elektrolytu, predovšetkým koncentráciu elektroaktívnej látky a teplotu. Odozvou systému je tzv. polarizačná krivka, resp. závislosť prúdu pretekajúceho elektródou na potenciále. Táto krivka býva tiež niekedy označovaná ako elektrochemické spektrum systému. Všeobecne existujú dva mezné prípady študovaných systémov. Jedná sa o elektródové deje vratné a nevratné. Pri reverzibilnej reakcii sa získa rovnako vysoký katodický a anodický pík. Pri vzrastajúcej ireverzibilite deju sa píky od seba vzdalujú a jeden z nich postupne vymizne. Zo vzdialenosti píku je tak isto možné určiť rychlostnú konštantu elektródového deju.[36]

4.3.4 Diferenčná pulzná voltametria

Pri použití pulzných metód je prúd meraný v presne definovanej dobe po vložení napätového pulzu. V DPV majú tieto pulzy tvar polobdĺžnikov s konštantnou výškou a šírkou. Tieto pulzy su superponované na napätovej rampe, ktorá sa lineárne mení v čase. Napätový pulz pri DPV trvá niekoľko desiatok milisekúnd, pričom sa meria prúd tesne pred počiatkom pulzu a na jeho konci. Výsledná krivka je potom rozdielom týchto dvoch hodnôt. Výsledkom je opäť krivka v tvare „píku“, kde poloha na potenciálovej ose odpovedá hľadanej látke a veľkosť prúdu koncentrácii látky v analyte. [34]



Obr. 6: Priebeh potenciálu a prúdu pri DPV. Potenciál vkladáný na pracovnú elektródu

4.3.5 Square wave voltametry

V priebehu tejto metódy je na elektródu tak isto vkladáný lineárne sa meniaci potenciál, ktorý je modulovaný napät'ovými pulzami. Tie su voči napät'ovej rampe pozitívne a negatívne. Prúd je meraný vždy tesne pred zmenou potenciálu, čiže ku koncu každého vloženého pulzu. Následne sa od seba odčítajú hodnoty prúdu na pozitívnom pulze a predchádzajúcom negatívnom. SWV môže na rozdiel od DPV pracovať v režime vysokých rýchlostí zmeny potenciálu a je vhodná hlavne k citlivej detekcii reverzibilných elektrochemických dejov.[34]

4.4 Detekcia s využitím biosenzoru

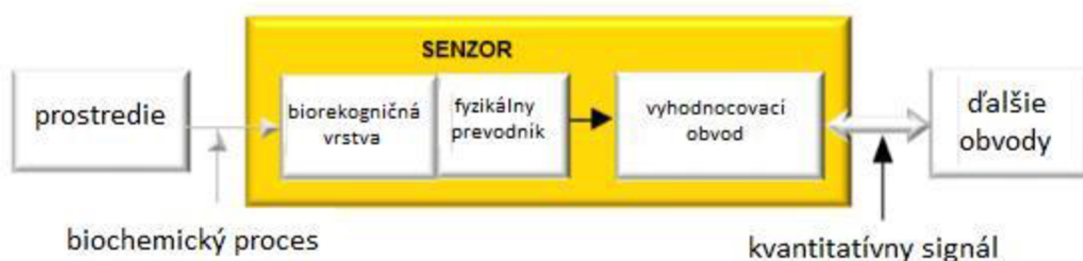
Biosenzor je analytický prístroj obsahujúci citlivý prvok biologického pôvodu, ktorý je buď súčasťou, alebo v tesnom kontakte s fyzikálno – chemickým prevodníkom. Poskytuje priebežný elektrochemický signál, ktorý je priamo úmerný koncentrácii jednej, alebo skupiny chemických látok v analyte. Hlavnými časťami biosenzoru sú bioreceptor a prevodník, ktoré sú integrované v jednom senzore.[43][44]

Signály z prevodníka sa ďalej spracúvajú elektronickými obvodmi. Výsledkom takejto kombinácie je schopnosť biosenzorov špecificky a veľmi citlivo určiť spektrum látok v procesoch analýzy. Ďalšou výhodou je nízky vplyv biosenzoru na biologické prostredie v ktorom pracujú. V porovnaní s konvenčnými metódami na detekciu niektorých veličín môže byť použité menej časovo a finančne náročné. Na druhej strane sa však potýkajú s nevýhodou vrámci nízkej časovej a mechanickej stability, ako pomerne náročnej prípravy.[43]

V biosenzoroch sa využíva priame prepojenie maticovo viazaného receptora, ktorým je bioaktívna látka, s elektronickým zariadením na prenos a ďalšie spracovanie signálu.

Zabudovaná molekula receptora vytvára s molekulami detekovanej látky komplex, ktorého vznik vyvoláva zmenu sledovaných parametrov – signál. S inými molekulami receptor neinteraguje, alebo zmeny sledovaných parametrov majú iný charakter. Fyzikálno – chemické premeny receptorov zapríčinené interakciou so sledovanou látkou sa detekujú potenciometrickými, alebo ampérometrickými elektródami, termistormi, optoelektrickými detektormi, alebo iným zariadením a premienajú sa na výstupný signál vo forme, ktorá môže byť zosilnená, zobrazená a uložená.[43][44]

Rekogničné elementy možno rozdeliť do dvoch skupín. Katalitické zahŕňajú enzýmy, mikroorganizmy a rastlinné, alebo živočíšne elementy. Medzi nekatalytické rekogničné elementy patria protilátky, receptory a nukleové kyseliny.



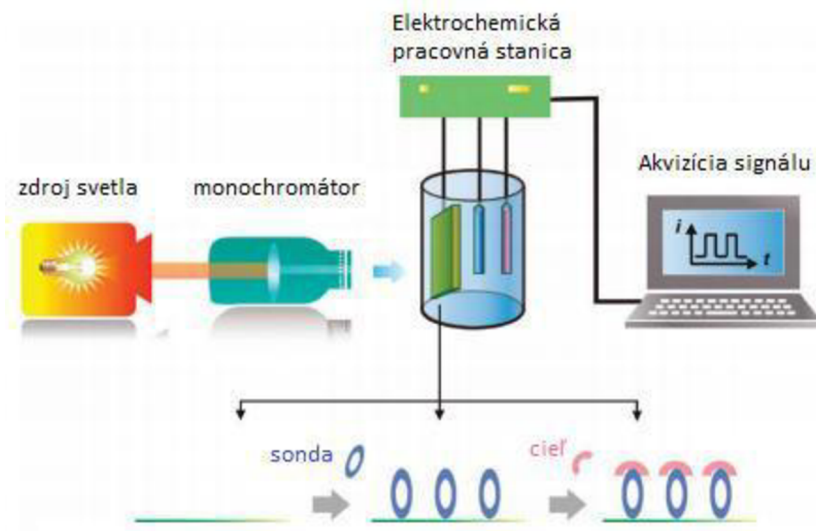
Obr. 7: Všeobecná schéma biosenzoru[44]

4.5 Fotoelektrochemické metódy

Fotoelektrochemický proces (PEC) je založený na premene fotónov na elektrický prúd, ktorá vyplýva z excitácie elektrónov a následného prenosu náboja z fotoexcitovaného materiálu pomocou svetelného zdroja. Jedná sa o evolučnú generáciu elektrochemickej metódy, ktorá poskytuje rôzne možnosti analýzy biologických interakcií. Hlavnými výhodami sú nízka nákladovosť, pomerne jednoduché prístrojové vybavenie a vysoká citlivosť. Ako vybudzovací element sa používa zdroj svetla a emitovaný fotoprúd zase slúži ako detekovaný signál. V dôsledku tohto úplného oddelenia a rôznych energetických foriem budiaceho zdroja a detekčného signálu ponúka táto metóda potenciálne vyššiu citlivosť, ako konvenčné elektrochemické metódy, v dôsledku zredukovaného signálu z pozadia.[45][46]

Analýza pomocou PEC môže byť rozdelená na základe rôznych kritérií. Podľa spôsobu interakcie s analytom môžu byť detekčné PEC metódy rozdelené biokatalytické zariadenia a afinitné senzory. Biokatalytické zariadenia inkorporujú biologické materiály, ako sú napríklad enzýmy, ktoré rozpoznávajú ich špecifické molekulové substráty.

Afinitné senzory pracujú na základe selektívnych väzbových interakcií medzi rekogničnou biomolekulou a analytom, akými sú napríklad imunokomplex antigen-protilátka, alebo DNA hybridizácia. Alternatívne môžu byť PEC biosenzory rozdelené podľa spôsobu prenosu signálu na potenciometrické a ampérometrické.[45][46]



Obr. 8: Schéma základného princípu PEC bioanalýzy[45]

5 UHLÍKOVÉ NANOTRUBICE

Uhlíkové nanotrubičky (CNTs) patria medzi alotropy uhlíku, ktoré vzhľadom k svojim jedinečným vlastnostiam ponúkajú uplatnenie v mnohých aplikáciách. Ich pozorovanie prebiehalo už v päťdesiatych rokoch, no ich objav je pripisovaný až prof. Iijimovi, ktorý v roku 1991 publikoval článok o príprave viacstenných uhlíkových nanotrubičiek vnorených do seba.[37]

5.1 Štruktúra a vlastnosti

Základným stavebným prvkom nanotrubičiek je grafén. Jedná sa o formu uhlíka s atómami, ktoré tvoria rovinnú šesťuhlíkovú štruktúru. Pokiaľ dôjde k zvinutiu takejto vrstvy, dostaneme jedностennú uhlíkovú nanotrubičku (SWNT). Závislosť smeru zbalenia dvojrozmerných grafénových vrstiev, ktorá je daná chirálnym vektorom \vec{R} určuje výslednú štruktúru uhlíkových nanotrubičiek. Chiralita ďalej ovplyvňuje vodivosť, hustotu, mriežkovú štruktúru a ďalšie vlastnosti nanotrubičiek.[37][38]

Uhlíkové nanotrubičky môžeme rozdeliť do dvoch základných kategórií. Prvým typom sú jedностenné CNTs, ktoré majú typický priemer 0,4 – 2 nm a dĺžku niekoľko mikrometrov. Druhým typom nanotrubičiek, ktoré boli využité v tejto práci, sú mnohostenné uhlíkové nanotrubičky (MWNT), tvorené z niekoľkých sústredených uhlíkových nanotrubičiek. Tie sú zpravidla v priemere väčšie ako 2 nm a ich dĺžka môže byť viac než 10 μm . Nanotrubičky majú dobré mechanické, elektrické a optické vlastnosti, sú pevné, pružné, tepelne stabilné a vyznačujú sa vysokou elektrickou a tepelnou vodivosťou. Medzi ich ďalšie vlastnosti, vďaka ktorým sú ideálne využiteľné k úprave povrchu elektródy, je skutočnosť, že môžu prenášať prúdy o vysokej hustote (10^3 A/m^2), pričom sú chemicky inertné a nesusú napádané silnými kyselinami, alebo zásadami.[37][38]

Uhlíkové nanotrubičky je možné vyrábať niekoľkými metódami, ktoré majú svoje výhody aj nevýhody a prirodzene vedú k syntéze rôznych typov CNTs. Medzi tri najčastejšie využívané technológie výroby patria výboj elektrického oblúku, laserová ablácia a chemická depozícia z pár.[38]

6 EXPERIMENTÁLNY PLÁN

Cieľom praktickej časti tejto práce je návrh biosenzoru pre detekciu metylovanej DNA a následná detekcia reálnych vzoriek, ktorá bola vykonaná pomocou DPV. Celý experiment bol rozdelený do štyroch hlavných blokov. Návrh senzoru, ktorý je schopný detekovať zmeny v štruktúre určitého úseku DNA sekvencie, akou je napríklad metylácia DNA, je založený na modifikácií detekčného povrchu elektródy určitou metódou. Prvý blok experimentu sa preto venuje práve zvoleniu a aplikácií vhodnej modifikácie elektródy. V tomto prípade bola zvolená modifikácia GCE pomocou MWNT a cholínu, ktorá má za úlohu zvýšiť citlivosť detekcie.

V druhom bloku bola uskutočnená optimalizácia jednotlivých parametrov, ktoré pri maximalizácii citlivosti metódy zohrávajú dôležitú úlohu. Jedná sa o parametre pre metódu DPV. Ako faktor, ktorý sa pri ich optimalizácii bral do úvahy bol ich vplyv na výšku a pološírku pík.

Tretí experimentálny blok bude venovaný metóde priamej detekcie zmesných vzoriek báz bez prítomnosti mC a s prítomnosťou mC. Na základe nameraných dát bude sledovaný trend v zmene charakteristických vlastností pík, ktorý bude ďalej využitý k stanoveniu prítomnosti mC vo vzorku. V poslednom štvrtom bloku, ktorý nadväzuje na metódu priamej detekcie z bloku tri, bude optimalizovaná metóda použitá na detekciu vzoriek oligonukleotidu s rôznym zastúpením mC prostredníctvom biosenzoru. Táto metóda je založená na inkubácií próby a následnej hybridizácii cieľovej sekvencie.

Výsledkom experimentu budú dáta z dvoch rôznych prístupov detekcie, na základe ktorých bude zvolenou metódou demonštrovaná prítomnosť mC vo vzorku.

7 MATERIÁLY A METÓDY

V tejto kapitole sú popísané všetky chemikálie, materiály, postup prípravy a jednotlivé metódy, ktoré vrámci celého experimentu boli využité.

7.1 Chemikálie

Všetky uvedené chemikálie, pokiaľ nie je uvedené inak, boli obstarané firmou Sigma – Aldrich Chemical Corporation (USA). Oxidované MWCNT boli zakúpené z PalmSens BV.

Na modifikáciu elektródy boli použité MWCNT, N,N-dimetylformamid, cholín, ACS voda, etanol a aluminiový prášok. V prípade biosenzoru boli použité oxidované MWCNT. Pre prípravu fosfátového pufru bol použitý 0,5M hydrogenufosforečnan sodný (Na_2HPO_4) a 0,5 M dihydrogenufosforečnan draselný (KH_2PO_4). Pre prípravu zmesných vzoriek nukleotidových báz boli použité bázy adenín, tymín, guanín, cytozín a metylcytozín. Pre detekciu boli zakúpené oligonukleotidové sekvencie nemetylovaným, polovične metylovaným a plne metylovaným obsahom cytozínu. Pre detekciu biosenzorom boli použité nasledujúce sekvencie

Próba: 5' –CATGGCGGGAC- 3'

Cielová (nemetylovaná): 5' – GTCCGCGCCATG – 3'

Cielová (polovičná metylácia): 5' – GTC[metC]G[metC][metC]CATG

Cielová (plne metylovaná): 5' - GT[metC][metC]G[metC]G[metC][metC]ATG

7.2 Prístrojové a softwarové vybavenie

Potenciostat Autolab PGSTAT101 (Metrohm, Švajčiarsko)

pH meter inolab, WTW (Weilheim, Nemecko)

Elektromagnetická miešačka RET (IKA, Švajčiarsko)

Analytické váhy BAS 31 (Boeco, Nemecko)

Ultrazvuková vaňa

Infralampa

NOVA (SW)

MagicPlot (SW)

SciDAVis (SW)

7.3 Príprava roztokov pre modifikáciu GCE

Vrámci modifikácie pracovnej elektródy boli využité dva druhy MWNTs – neoxidované a oxidované. V oboch prípadoch boli zhotovené zásobné roztoky rozpustením $0,75 \text{ mg.ml}^{-1}$ MWNT v N,N-dimetylformamide. Pre prípravu cholínu bol zhotovený zásobný roztok 18 mM cholínu rozpusteného v ACS vode.

7.4 Príprava pufru a roztokov báz

Pre experiment bol ako elektrolyt zvolený 0,5 M fosfátový pufr o pH 7,0. Postup prípravy zásobného roztoku pufru o objeme 500 ml bol nasledovný: Na analytických váhach bolo odvažených 6,8 g KH_2PO_4 , ktoré boli následne rozpustené v 300 ml Mili-Q vody. V druhých 300 ml bolo rozpustených 7,1 g Na_2HPO_4 . Pri teplote 25 °C boli následne tieto dva roztoky miešané a za pomoci pH metru bolo docielené pH 7,0.

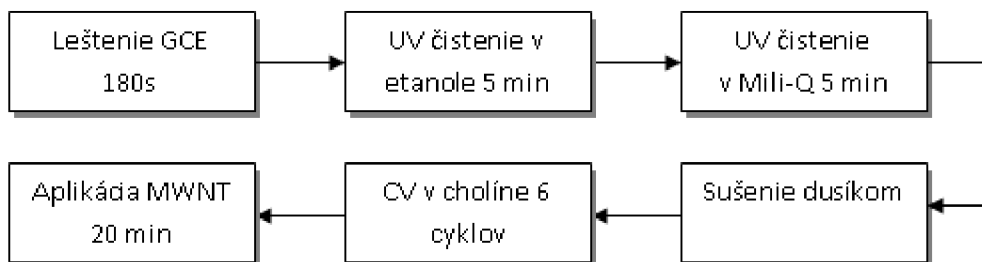
Na prípravu roztokov jednotlivých báz (A, C, G, T, mC) bol použitý 0,5 M fosfátový pufr o pH 7,0. Navážky báz o hmotnosti 45 mg boli rozpustené v 50 ml ACS vody. Všetky roztoky, pokiaľ neboli práve používané boli skladované v chladničke pri teplote 4°C.

7.5 Modifikácia elektródy

Pre detekciu DNA prostredníctvom vybraných metód bola zvolená sklená uhlíková elektróda (GCE). V prvom kroku modifikácie elektródy bol detekčný povrch ručne leštený pomocou aluminiového prášku po dobu 180 sekúnd. Po vyleštení detekčnej plochy elektródy je vyžadované ultrazvukové premytie v etanole a Mili-Q vode, postupne po dobu 10 minút, aby došlo k úplnému odstráneniu akýchkoľvek nečistôt a zvyškov aluminiového prášku. Posledným krokom pred samotnou modifikáciou je vysušenie elektródy, a to pomocou dusíku. Možnou alternatívou je voľné vysušenie elektródy na vzduchu, alebo pomocou sušiarne, no pri týchto postupoch môže dôjsť k opätovnému znečisteniu plochy a navyše sú pomerne zdĺhavé, čo je pri už aj tak časovo náročnej modifikácii nežiaduci faktor.

Takto prečistená elektróda bola v prvom kroku modifikácie upravená cholinovou vrstvou (Ch/GCE). Elektróda ponorená do 0,1 M roztoku fosfátového pufru o pH 7,0 s obsahom 1,8 mM cholínu bola skenovaná metódou cyklickej voltametrie v okne s rozmedzím -1,70 až 1,80 V, počas šiestich cyklov s rýchlosťou zmeny potenciálu 20 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Význam cholinového filmu pri konštrukcii biosenzoru má dva aspekty. V prvom prípade poskytuje stailnú monovrstvu s $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ polárnymi koncovými skupinami, ktoré vykazujú pozoruhodné elektrokatalytické vlastnosti smerom k oxidácii báz DNA. Druhou výhodou je skutočnosť, že poskytuje priaznivý podporný substrát pre naviazanie MWNTs. Kladne nabitá vrstva cholínu zvyšuje hustotu aktívnych miest GCE, čo sa javí ako prospešne pre stavbu MWNTs prostredníctvom elektrostatickej interakcie medzi pozitívne nabitou $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ polárnou skupinou cholínu a negatívne nabitými karboxilovými skupinami MWNTs. V dôsledku toho sa MWNTs boli schopné homogénne vstavať na povrch Ch/GCE, čo dokazuje, že cholinová vrstva môže poskytnúť vhodné lokálne mikro prostredie pre MWNTs.

V druhom kroku boli MWNTs dispergované v N,N-dimetylformamide (DMF) sonikované po dobu 30 minút. Výsledná MWNTs/Ch/GCE bola vytvorená nanosením 8 μ l MWNTs – DMF suspenzie na povrch elektródy upravenej pomocou cholínu a takto získaný povrch bol v poslednom kroku sušený po dobu 20 minút pod infra lampou. Sušenie je zároveň posledným krokom modifikácie elektródy, čím je elektróda pripravená k meraniu.



Obr. 9: Blokové schéma modifikácie GCE

7.6 Diferenčná pulzná voltametria

Detekcia jednotlivých signálov zo zmesných roztokov báz a troch cieľových sekvencií oligonukleotidu bola vykonaná na metodu diferenčná pulzná voltametria s využitím prístroja Autolab PGSTAT101 a softwaru NOVA. Počas merania sa pracovalo s klasickým trojelektrodovým zapojením. Výsledkom merania je voltamogram, z ktorého je možné kvantitatívne (podľa prúdového píku) hodnotiť látky v elektrolyte. Pracovnou elektródou bola modifikovaná GCE, referenčnou elektródou bola argentchloridová elektróda a ako pomocná elektróda bola zvolená platinová elektróda. Všetky analyzované vzorky boli pred detekciou zbavené kyslíku prostredníctvom prebublávania argónom (99,999%) po dobu 90 sekúnd. Pre všetky merania počas experimentu bola zvolená DPV s nasledujúcimi optimalizovanými parametrami: Detekčné okno určené počiatočným a koncovým potenciálom 0,4 – 1,6 V, amplitúda pulzu 0,07 V, čas pulzu 0,05 s, potenciálový krok 0,005 V a čas potenciálového kroku 0,5 s. Depozičný čas bol nastavený na hodnotu 90 s pri potenciáli 0,4 V.

7.7 Metóda priamej detekcie

Na základe vyššie popísanej optimalizovanej metódy DPV bola prevedená detekcia dvoma odlišnými prístupmi. Tým prvým je metóda založená na priamej detekcii jednotlivých báz v analyte na základe ich oxidačných potenciálov, čo znamená, že cieľová sekvencia je priamo detekovaná z elektrolytu. Pri všetkých meraniach vykonaných touto metódou bol použitým elektrolytom, ktorý poskytoval vhodné elektrochemické prostredie 0,5 M fosfátový pufr o pH 7,0.

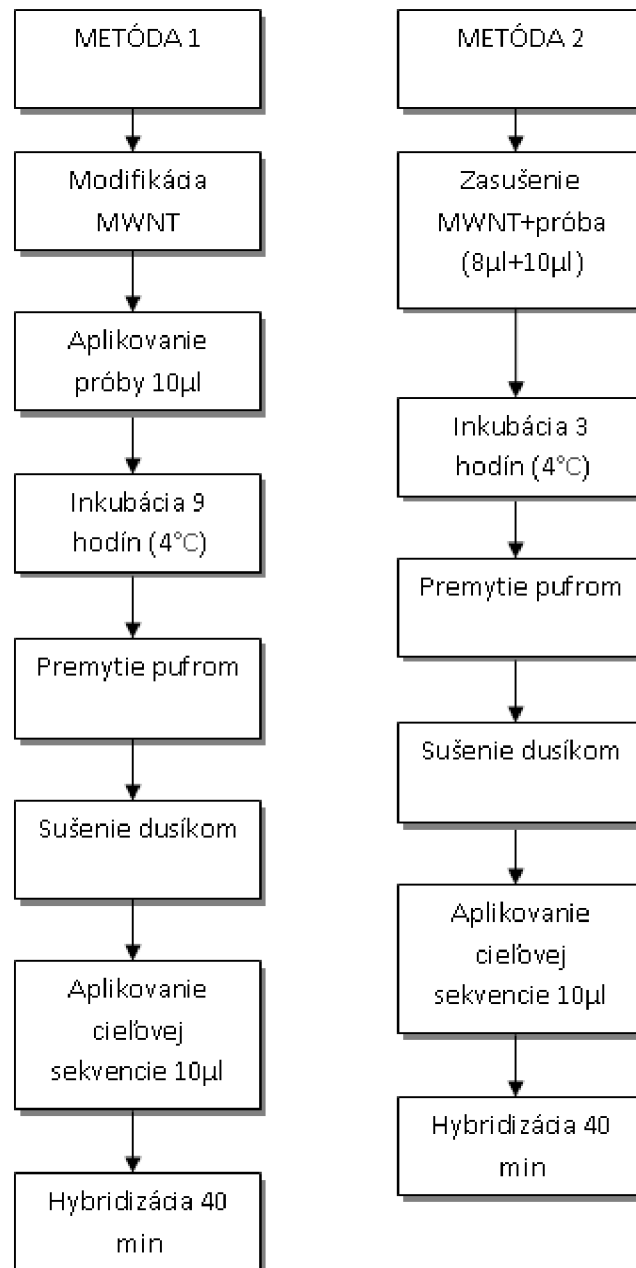
7.8 Hybridizácia cieľovej vzorky pri detekcii biosenzorom

Druhým zvoleným prístupom detekcie metylácie DNA bola detekcia biosenzorom, ktorá je založená na nepriamej detekcii hybridizovanej cieľovej sekvencie. Tento prístup vyžaduje pred samotnou detekciou zopár nutných krokov v podobe modifikácie GCE, inkubácie próby a samotnej hybridizácie cieľovej sekvencie. V tejto práci sú biosenzorom namerané dáta pomocou dvoch prístupov, ktoré sa líšia v jednotlivých krokoch (modifikácia, inkubácia a hybridizácia).

Prvá metóda je započatá modifikáciou GCE pomocou oMWNTs rovnakým spôsobom, ako tomu je v prípade nepriamej detekcie. Následne sa na zasušený povrch elektródy naniesie 10 μl próby (100 μM) a inkubuje sa v chladničke pri teplote 4 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 9 hodín. Následne je elektróda premytá vo fosfátovom pufré a vysušená prúdom dusíku. V poslednej fáze sa na elektródu naniesie cieľová sekvencia, ktorá hybridizuje s próbou po dobu 40 minút pri izbovej teplote.

Druhá metóda sa líši už v prvom kroku, kedy sa na povrch elektródy zasušuje oMWNT spolu s próbou. V tomto prípade boli zachované objemy 8 μl oMWNT a 10 μl próby. Celkovo je teda pod infra lampou zasušovaný roztok próby a oMWNT o objeme 18 μl . Tento objem bol zároveň horným maximom objemu, ktoré je na povrch elektródy možné zasušiť bez toho aby došlo k zbytočným stratám jednotlivých látok roztečením po stene elektródy. Po zasušení nasleduje opäť inkubácia, tentokrát však po dobu 3 hodiny. Postup hybridizácie je v tomto prípade rovnaký, ako pri prvej metóde.

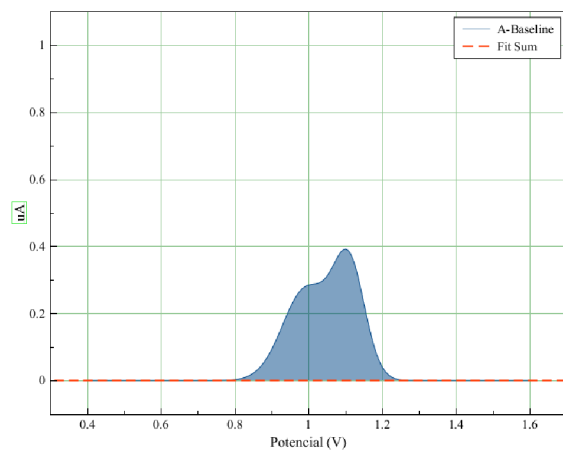
Takto hybridizovaná vzorka je následne detekovaná v elektrolyte, ktorým bol aj v tomto prípade 0,5 M fosfátový pufr o pH 7,0. Namerané dáta pochádzajú zo sekvencií nemetylovaných, s polovicou cytozínu metylovaného a s metylovanými všetkými cytozínmi. Namerané dáta boli aj v tomto prípade analyzované prostredníctvom MagicPlotu, na základe čoho bola opäť stanovená prítomnosť mC v sekvenciách.



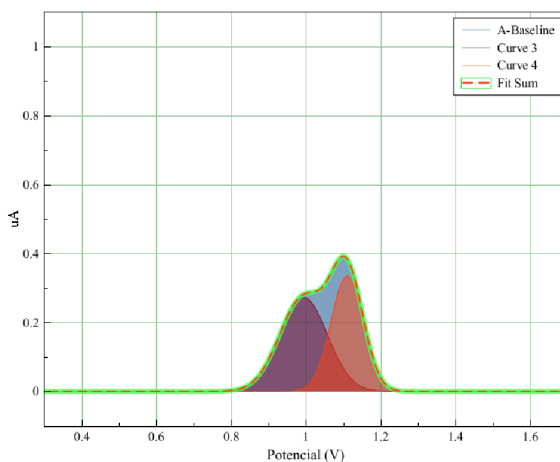
Obr. 10: Blokové schémy dvoch metód detekcie biosenzorom

7.9 Práca s programom MagicPlot

Existujú situácie, ako napríklad v prezentovanej detekcii 5-metylcytozínu, keď sa elektrochemický signál skladá z píkov, ktoré sa buď čiastočne, alebo úplne prekrývajú. V takom prípade je kvantitatívna analýza jednotlivých zložiek veľmi náročná, nakoľko nedokážeme z voltamogramu presne určiť charakteristické vlastnosti (výška, pozícia, pološírka,...) prekrývajúcich sa píkov. Tento problém môže byť pomerne efektívne riešený použitím numerických algoritmov na báze tzv. „curve fittingu“. Jedná sa o metódu, kedy sa pomocou viacerých kriviek s rôznymi vlastnosťami (gauss, lorentzian, parabola,...) snažíme namodelovať obálku pôvodného signálu. Týmto spôsobom sa dá pomerne jednoznačne určiť, či sa na odpovedajúcom mieste vo voltamograme jedná o signál pochádzajúci z jedného píku, alebo o signál zložený vplyvom prekrývajúcich sa píkov. Táto metóda „curve fittingu“ bola použitá v tejto práci pri detekcii 5-metylcytozínu.



Obr. 11: Dvojpík na voltamograme



Obr. 12: Ukážka postupu pri "curve fittingu"

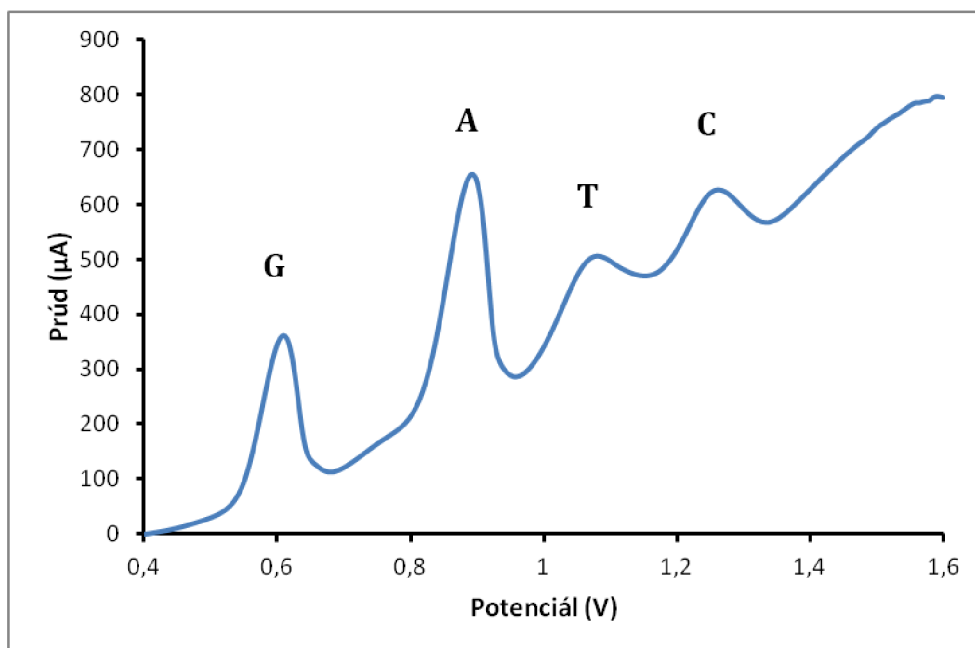
8 VÝSLEDKY

8.1 Optimalizácia elektrochemickej detekcie DNA

Ešte pred tým, ako došlo k samotnej detekcii a získavaniu jednotlivých dát, bolo potrebné nastaviť optimálne parametre. V tejto kapitole sú prezentované jednotlivé výsledky optimalizácie.

8.1.1 Voľba detekčného okna

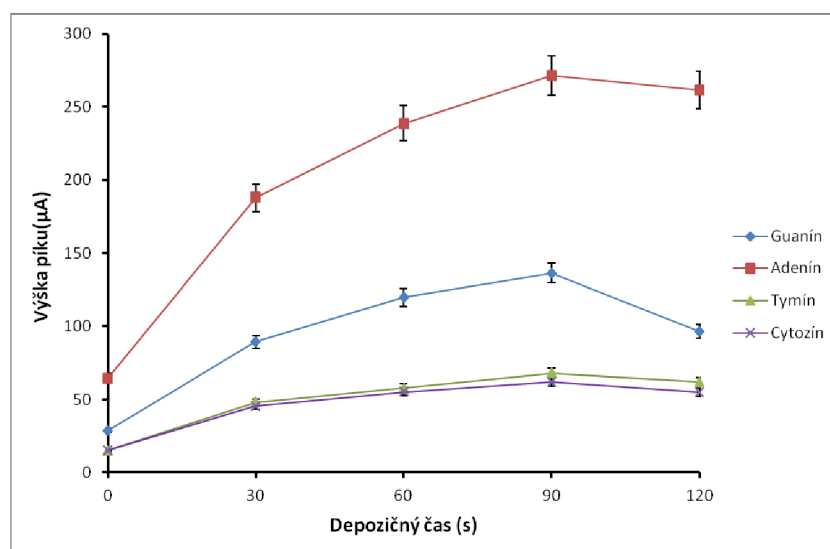
Prvým parametrom podrobeným optimalizáciou bolo nastavenie správneho okna, v ktorom bude signál z analytu zaznamenaný na voltamograme. Jedná sa o dôležitý aspekt, nakoľko voľba nesprávnej šírky okna môže znamenať neúplny, alebo len čiastočný záznam. Pre nastavenie správnej šírky okna je dôležité poznať oxidačné potenciály jednotlivých báz. Z teórie o elektrochemickej aktivite DNA vyplýva, že potenciál jednotlivých píkov báz na voltamograme pre guanín, adenín, tymín a cytozín je v tomto poradí približne 0,68 V, 0,94 V, 1,16 V a 1,34 V. Ich pozícia sa navyše pri rôznych podmienkach, ako napr. pH elektrolytu, môže meniť. Rozmedzie okna preto bolo nastavené počiatočným a koncovým potenciálom na hodnoty 0,4 – 1,6 V.



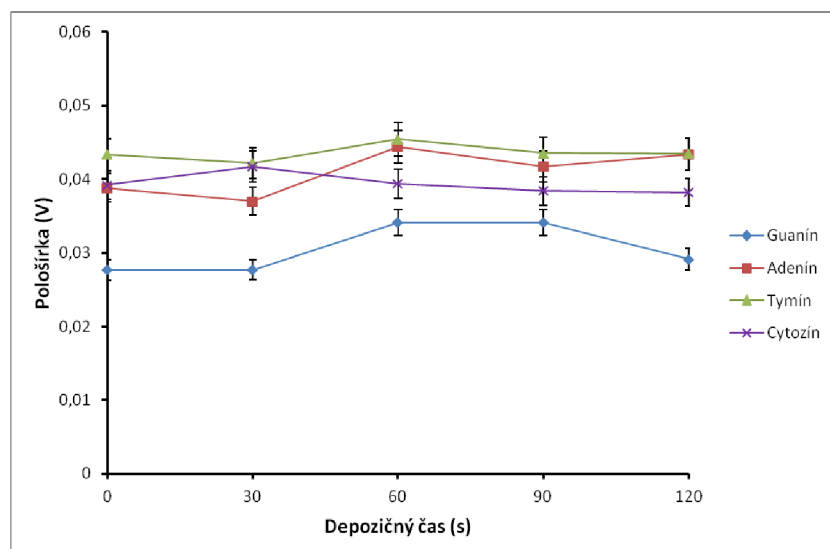
Obr. 13: Signál zmesného roztoku bází v detekčnom okne 0,4 – 1,6 V

8.1.2 Depozičný čas

Ďalším optimalizovaným parametrom, ktorý má významný vplyv na výsledok je depozičný čas. Postupne boli namerané záznamy pri depozičnom čase 0, 30, 60, 90 a 120 sekúnd. Pri každom zázname boli následne analyzované výšky a pološírky jednotlivých pík. Z uvedených grafov je zrejmé, že už len samotná inicializácia depozičného času má značný vplyv na výšky pík. S rastúcim časom depozičie sa zvyšovali až po dobu depozičie 120 sekúnd, kedy nastal mierny prepád. Čo sa týka pološírky, v tomto prípade nenastala v závislosti na čase depozičie žiadna výrazná zmena. Pri čase depozičie 120 sekúnd môžeme pozorovať mierne zúženie píku guanínu, ktoré ale sprevádza značný pokles jeho výšky. Na základe uvedených faktov sa tak za optimálny považoval depozičný čas 90 sekúnd.



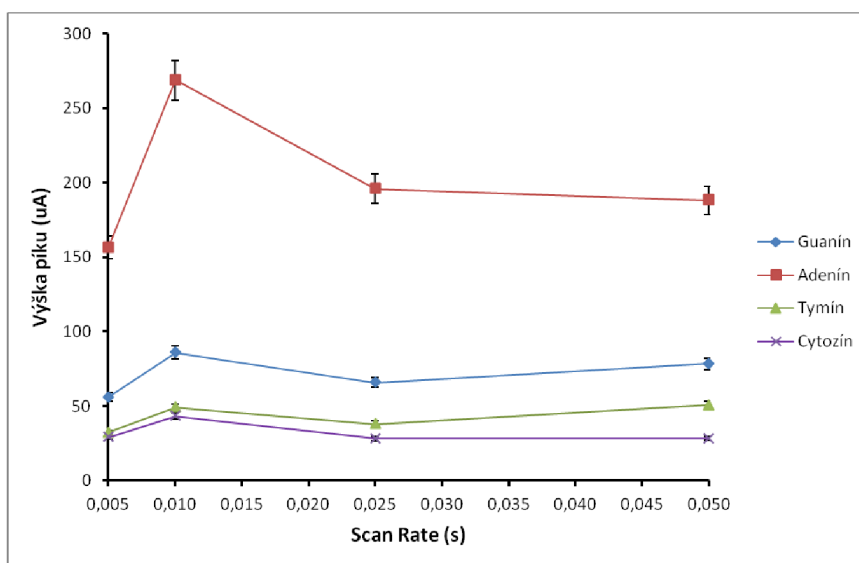
Obr. 14: Závislosť výšky pík na depozičnom čase



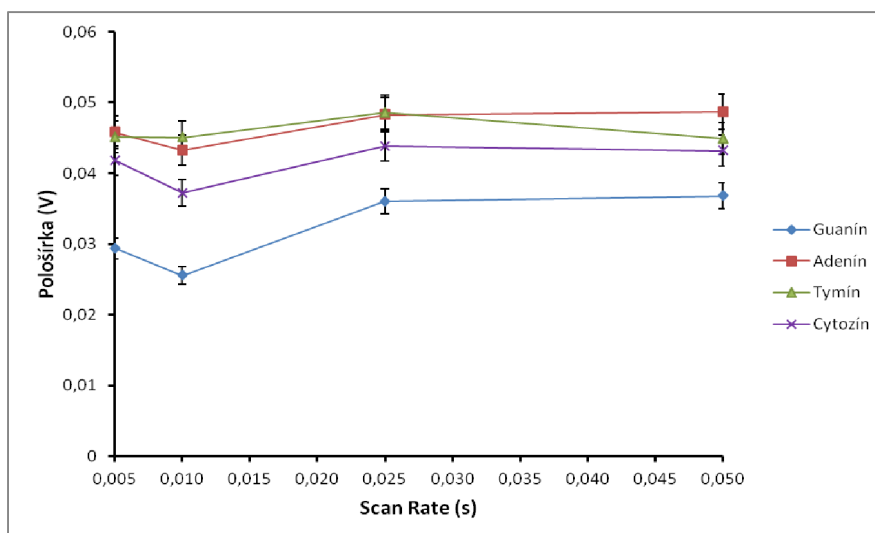
Obr. 15: Závislosť pološírky pík na depozičnom čase

8.1.3 Scan rate

Scan rate (V/s) je hodnota, ktorá je pomer parametrov step potential (V) a interval time (s). Pri optimalizácii boli záznamy namerané pri hodnotách scan ratu 0.005 sekúnd, 0.01 sekúnd, 0.025 sekúnd a 0.05 sekúnd. Významný rozdiel nastal pri hodnote 0.01 sekúnd, kedy boli všetky štyri píky zaznamenané s veľkou zmenou ich výšok. Taktiež pri analýze pološírky pík boli pri tejto hodnote získané najoptimálnejšie hodnoty.



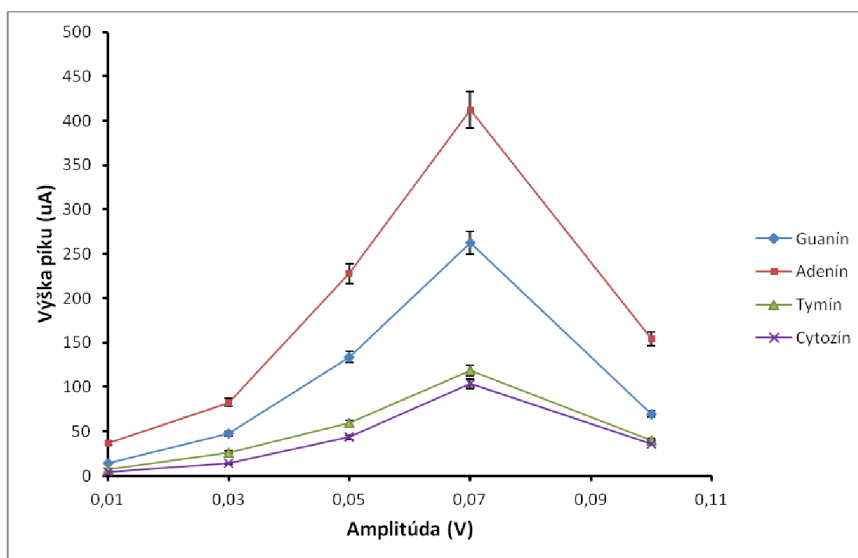
Obr. 17: Zavislost' pološírky pík na scan rate



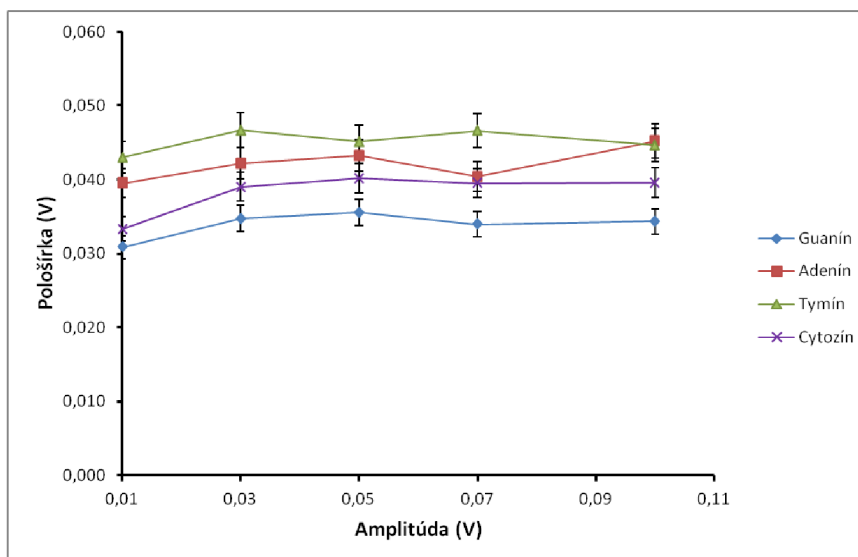
Obr. 16: Zavislost' výšky pík na scan rate

8.1.4 Amplitúda

Posledným zmeneným parametrom, ktorý bol optimalizovaný je amplitúda. Z grafu závislosti výšky píku na amplitúde je viditeľný pravidelný nárast výšok píkov so zvyšujúcou sa hodnotou amplitúdy a následný výrazný pokles pri hodnote 0.1 V. Pološírka píkov sa so zmenou amplitúdy mení len veľmi jemne, avšak pri hodnote 0.7 V je možné vidieť určité zúženie píkov odpovedajúcich adenínu a guanínu. Z týchto dôvodov bola ďalej táto hodnota amplitúdy považovaná za optimálnu.



Obr. 18: Závislosť výšky píkov na amplitúde

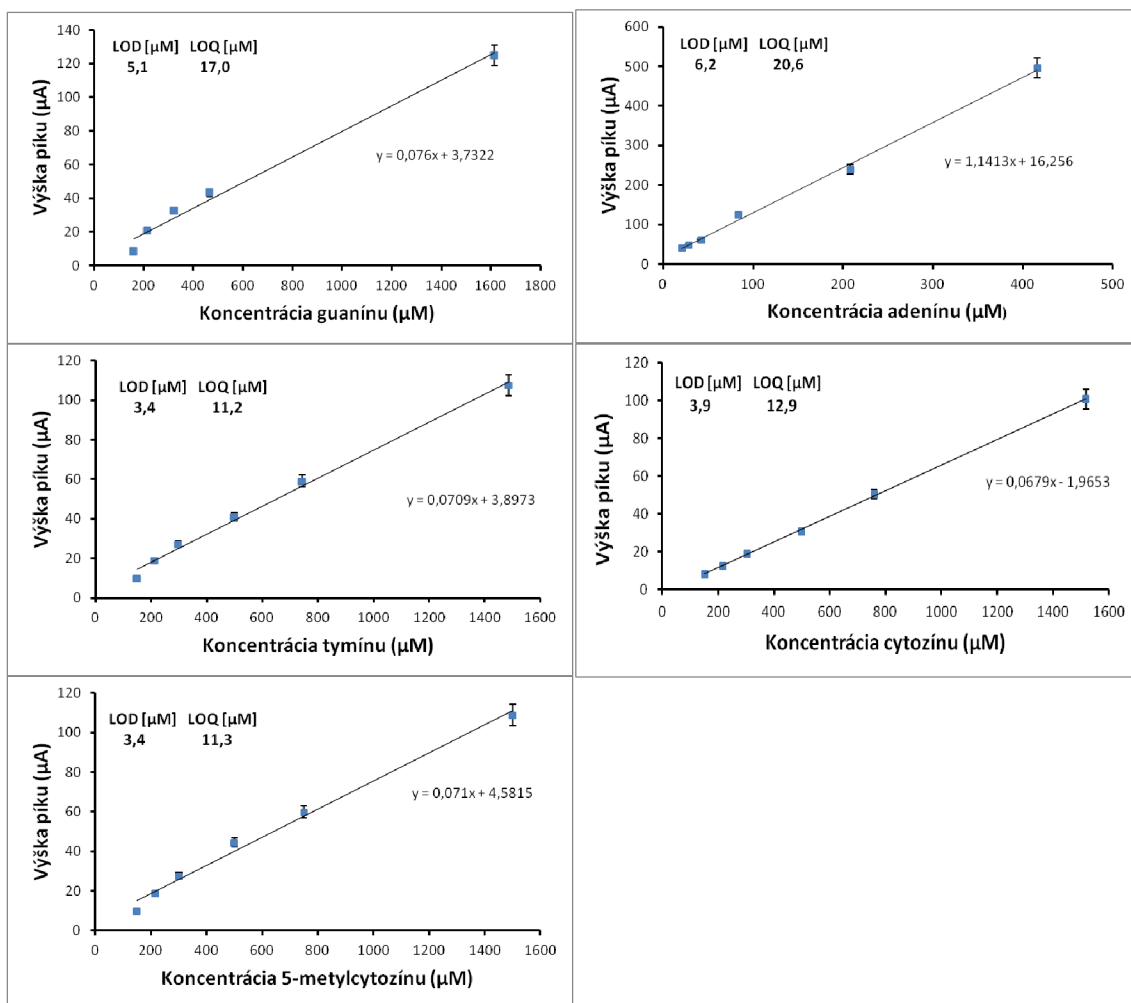


Obr. 19: Závislosť pološírky píkov na amplitúde

8.2 Priama detekcia

Druhý blok experimentálnej časti sa zaoberá stanovením jednotlivých bází, na základe ktorého boli zhotovené kalibračné krivky pre všetkých päť bází samostatne. Pre všetky bázy bol následne vypočítaný limit detekcie. Nasledujúcim krokom bolo porovnanie jednotlivých GCE z pohľadu stability ich detekcie. Počas celého experimentu bolo k dispozícii štyri rovnaké typy GCE, ktoré boli zakaždým modifikované rovnakým postupom. Nasledovalo stanovenie metylovaného cytozínu a jeho interferencia s jednotlivými bázami. Na základe toho boli zmesné roztoky mC s Tymínom v rôznych pomeroch, na základe ktorých je vidno charakteristický trend v tvare píku, ktorý je týmito dvoma bázami tvorený. Pre odlišenie oboch píkov a stanovenie mC vo vzorku bola v poslednom kroku použitá metóda „curve fittingu“.

8.2.1 Kalibračné krivky

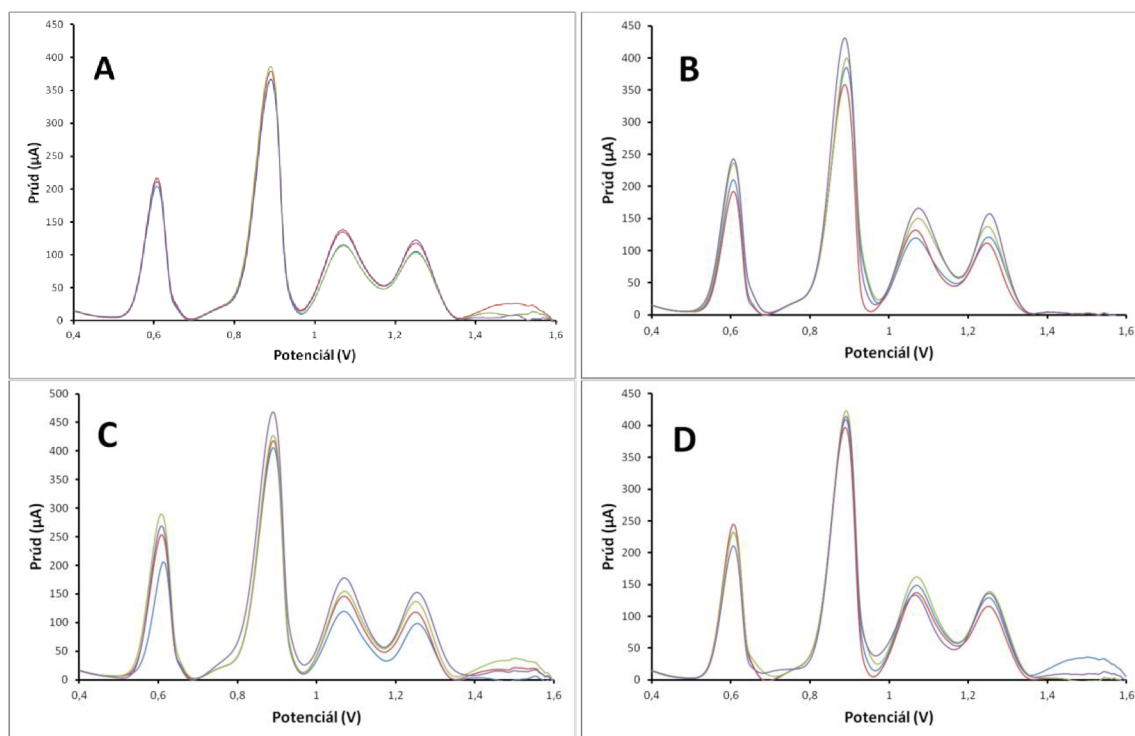


Obr. 20: Kalibračné krivky jednotlivých bází

	rovnica regresie	LOD (μM)	LOQ (μM)	Lin. Dynamický rozsah
Guanín	$y = 0,076x + 3,7322$	7,7	25,7	5780
Adenín	$y = 1,1413x + 16,256$	6,2	20,6	6580
Tymín	$y = 0,0709x + 3,8973$	3,4	11,2	6990
Cytozín	$y = 0,0679x - 1,9653$	4,6	15,4	7950
5-mCytosín	$y = 0,071x + 4,5815$	3,4	11,4	7050

Tab. 1: Štatistika vyplývajúca z kalibračných kriviek

8.3 Hodnotenie stability elektród

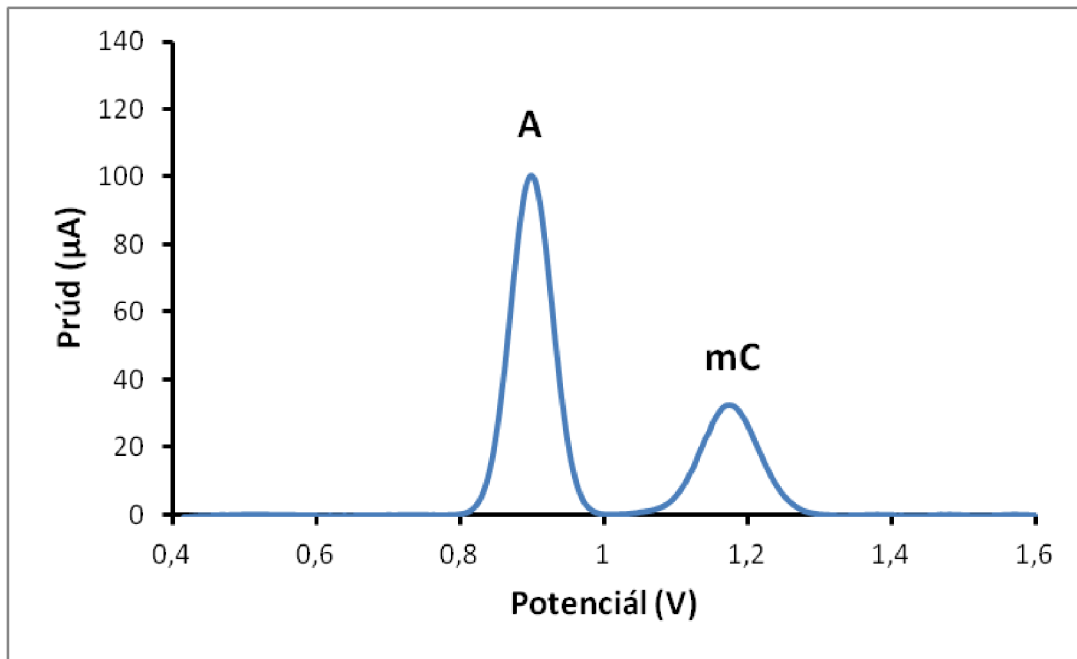


Obr. 21: Porovnanie stability štyroch rovnakých GCE

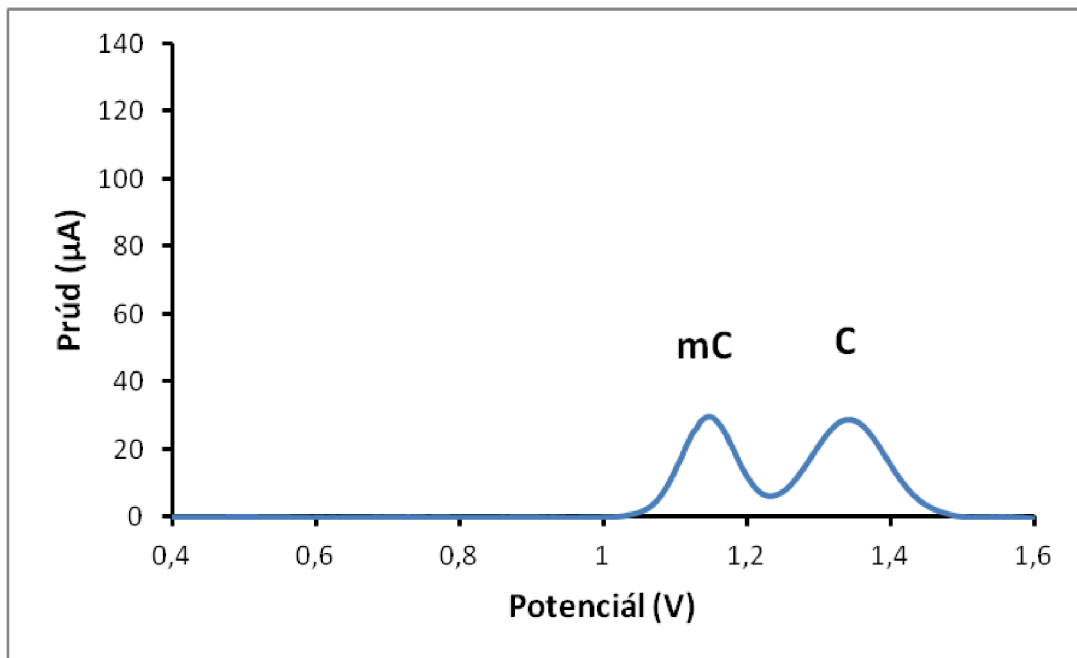
	A		B		C		D	
	Priemer (μA)	σ (μA)	Priemer (μA)	σ (μA)	Priemer (μA)	σ (μA)	Priemer (μA)	σ (μA)
Guanín	211,08	5,03	212,97	3,21	253,98	35,54	229,53	14,82
Adenín	374,08	10,31	372,13	11,76	428,90	27,07	411,35	9,00
Tymín	125,43	12,46	131,28	8,02	149,40	24,11	146,45	12,15
Cytozín	112,23	9,22	118,33	4,66	126,38	23,60	134,63	4,26

Tab. 2: Porovnanie stability elektród na základe výšok pík

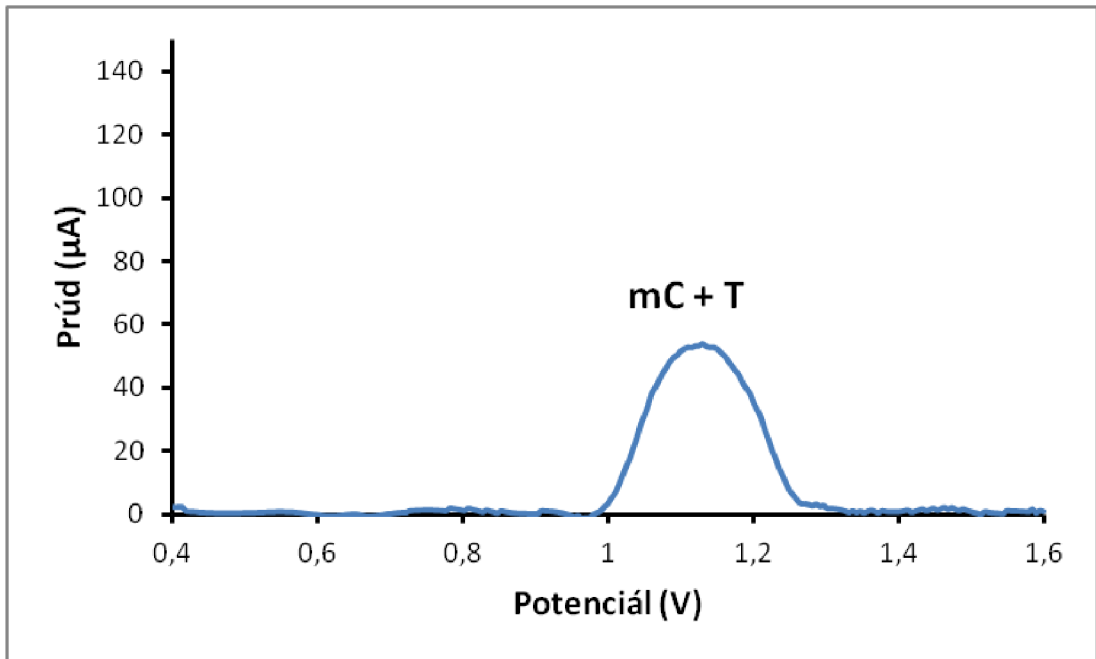
8.3.1 Interferencia bází s 5-mC



Obr. 23: Voltamogram zmeraného roztoku adenínu a metylcytozínu

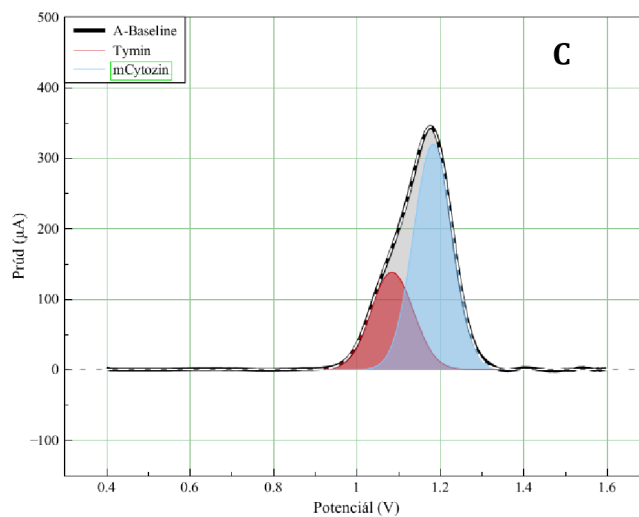
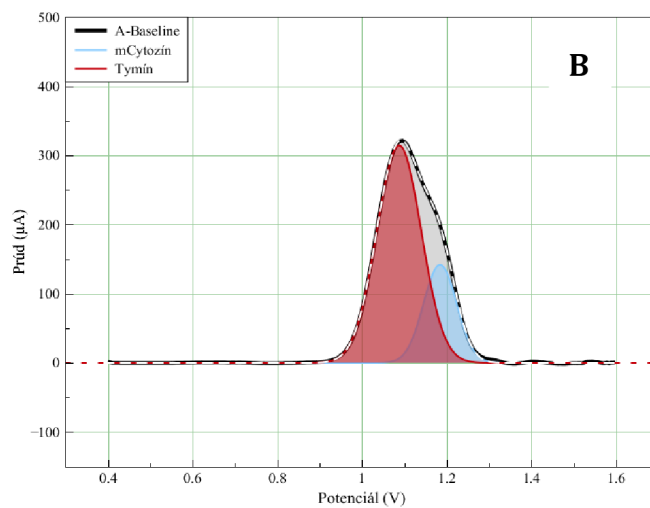
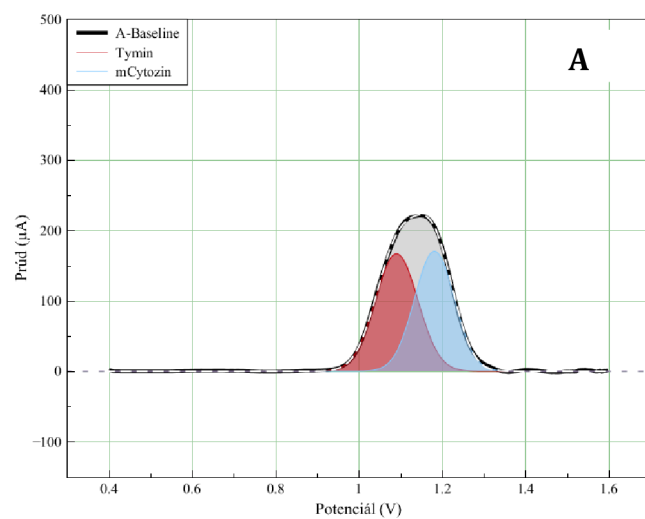


Obr. 22: Voltamogram zmeraného roztoku metylcytozínu a cytozínu



Obr. 24: Voltamogram zmeranáho roztoku metylcytozínu a tymínu

Z nameraných dát je zrejmé, že adenín a tymín svojimi pozíciami píkov nijak významne neinterferujú s pozíciou metylcytozínu. Naopak pozícia tymínu je na voltamograme v rovnakých miestach ako je mC, čo budí dojemom, že sa jedná o jeden pík. Aby sme mohli s určitosťou konštatovať, že na danej pozícií sú píky dva, bolo potrebné zmerať zmesný roztok týchto dvoch bází v rôznych pomeroch a tým sledovať určitý trend v zmene tvaru tohto zloženého píku.

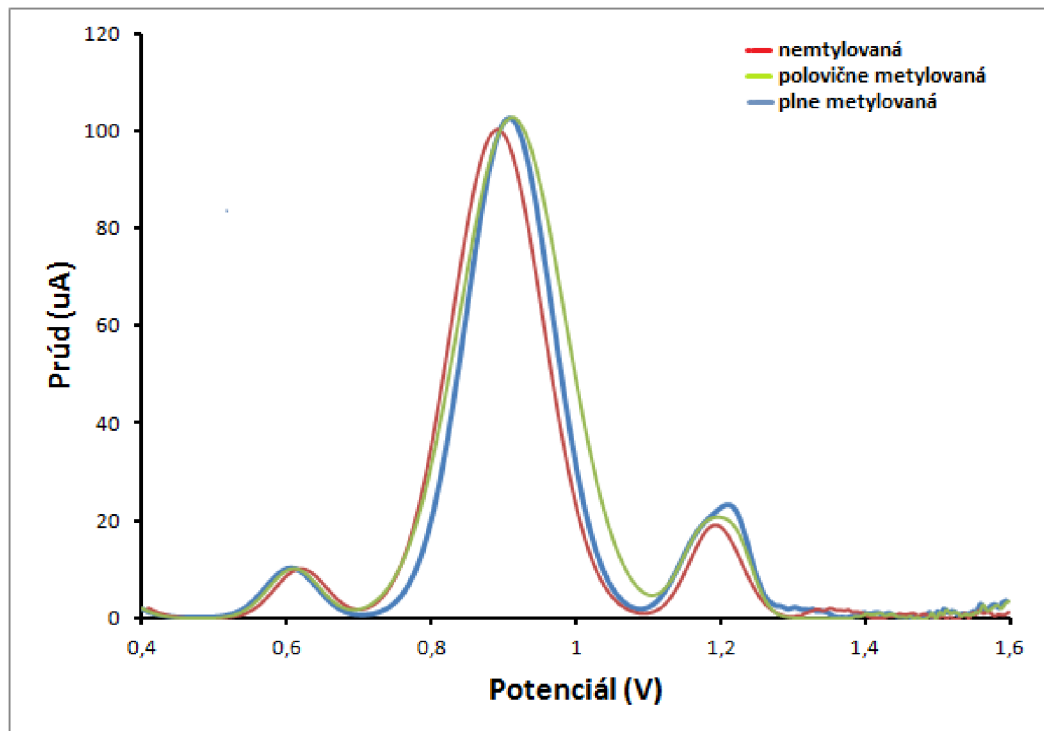


Obr. 25: Voltamogramy analyzované metódou "curve fitting" pomocou programu MagicPlot. Pomer bází 1:1(A), pomer bází 5:1 v prospeh tymínu (B) a pomer bází 1:5 v prospeh 5-mC (C)

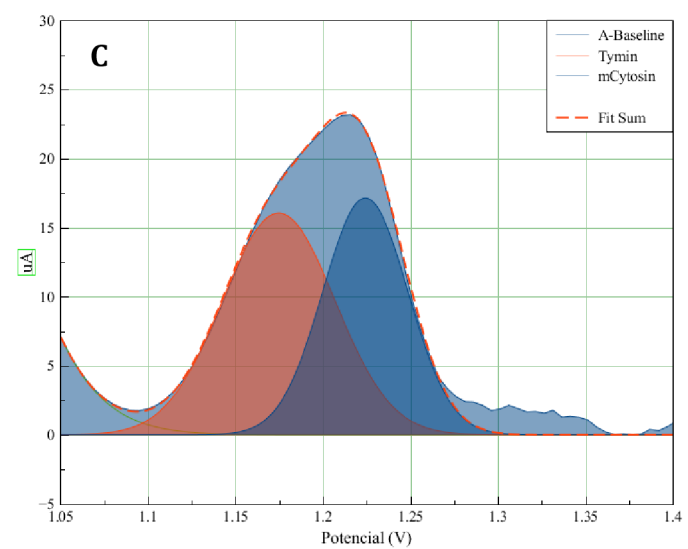
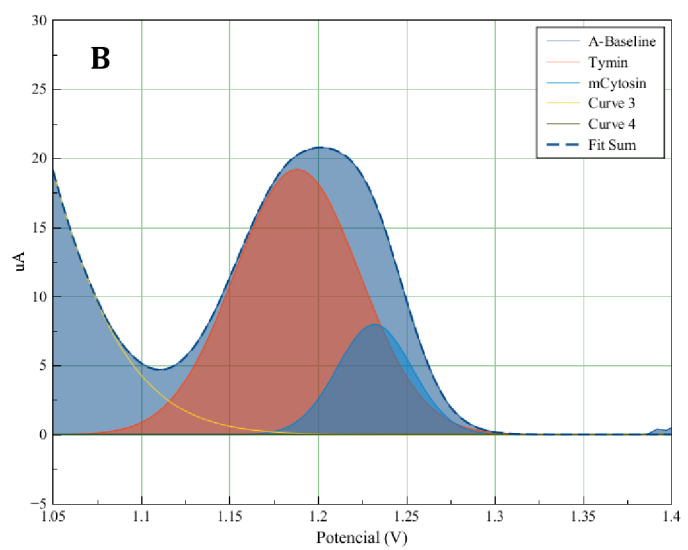
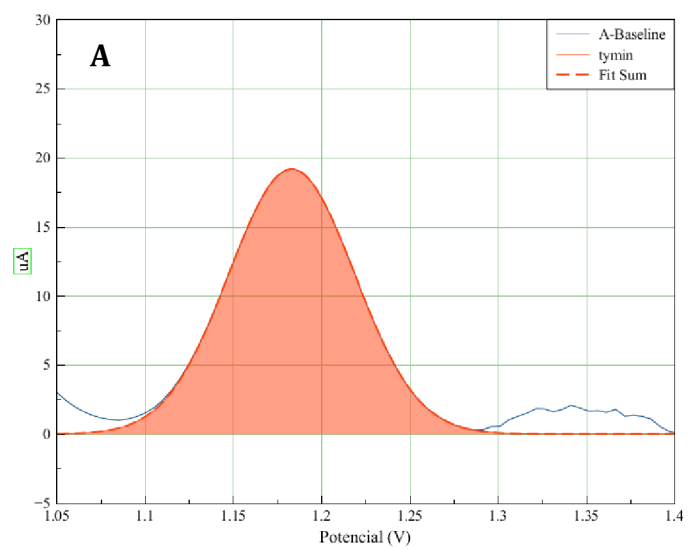
Na prvom zázname na obrázku je zmesný roztok metylcytozínu a tymínu v pomere 5:1, na druhom voltamograme je pomer oboch bází rovnaký. Na poslednom treťom zázname je pomer bází opäť 5:1, no tentokrát s väčším objemom tymínu. Pri porovnaní všetkých troch záznamov je jasne vidieť trend v zmene tvaru píku pri meniacich sa pomeroch oboch bází. Na prvom a treťom zázname môžeme sledovať tvorbu tzv. dvojpíku, ktorý vzniká práve tým, že obe bázy sa na voltamograme nachádzajú v tesnej blízkosti. Pri rovnakom pomere bází je vidieť, že tento mierny dvojpík vymizol, a nevieme tak na prvý pohľad určiť, či sa jedná o zložený signál, alebo tvorený len jednou bázou. Pri porovnaní tohto voltamogramu so záznamom samotného tymínu, resp. samotného metylcytozínu však môžeme vidieť určité charakteristické črty v tvare jednotlivých píkov.

8.4 Detekcia biosenzorom

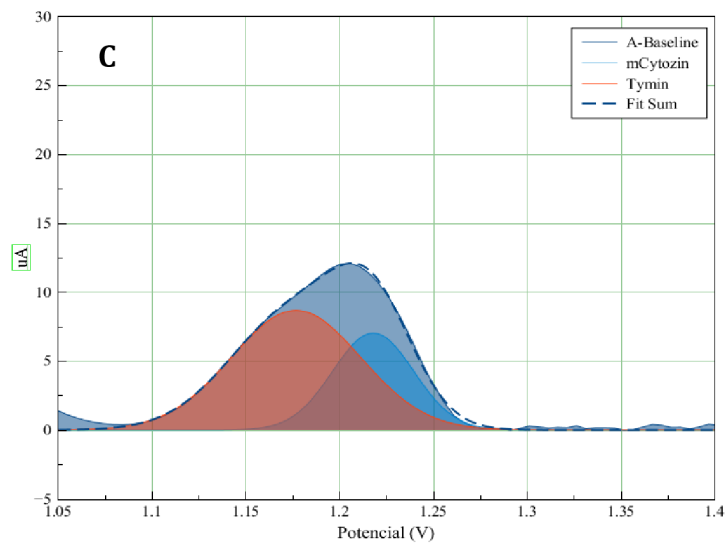
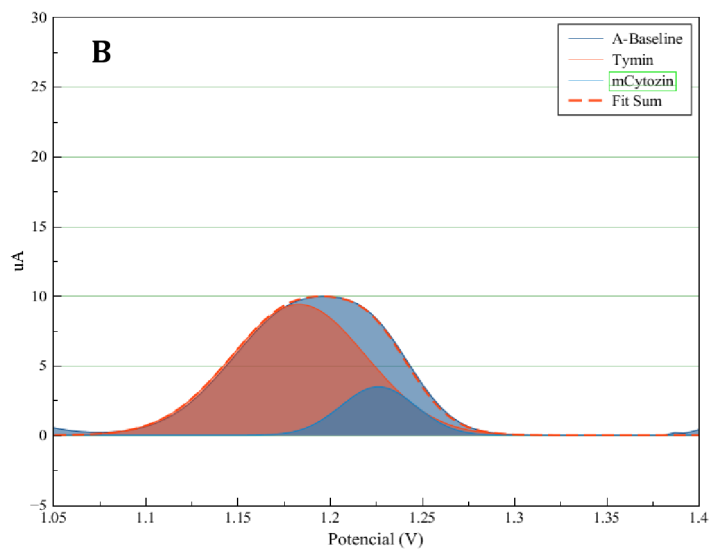
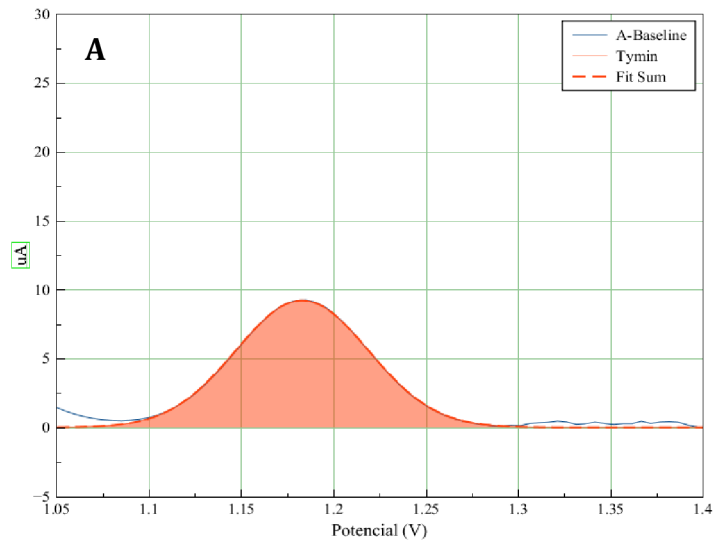
Druhým prístupom detekcie boli zamerané tri rozdielne vzorky oligonukleotidovej sekvencie v koncentráciách 100 μM a 50 μM . Jednotlivé sekvencie sa líšili v počte metylovaných bází cytozínu. Vzorka č. 1 neobsahovala žiadnu metylovanú bázu, vzorka č. 2 mala polovicu cytozínov v metylovanej forme a posledná vzorka č. 3 mala všetky cytozíny v sekvencii metylované.



Obr. 26: Voltamogram všetkých troch oligonukleotidových sekvencií (nemetylovaná, polovične metylovaná a plne metylovaná)



Obr. 27: Postup stanovenia 5-mC pri troch sekvenciách (100 μM) – nemetylovaná (A), polovica mC (B) a všetky cytozíny metylované (C)



Obr. 28: Postup stanovenia 5-mC pri troch sekvenciách (50 μM) – nemetylovaná (A), polovica mC (B) a všetky cytozíny metylované (C)

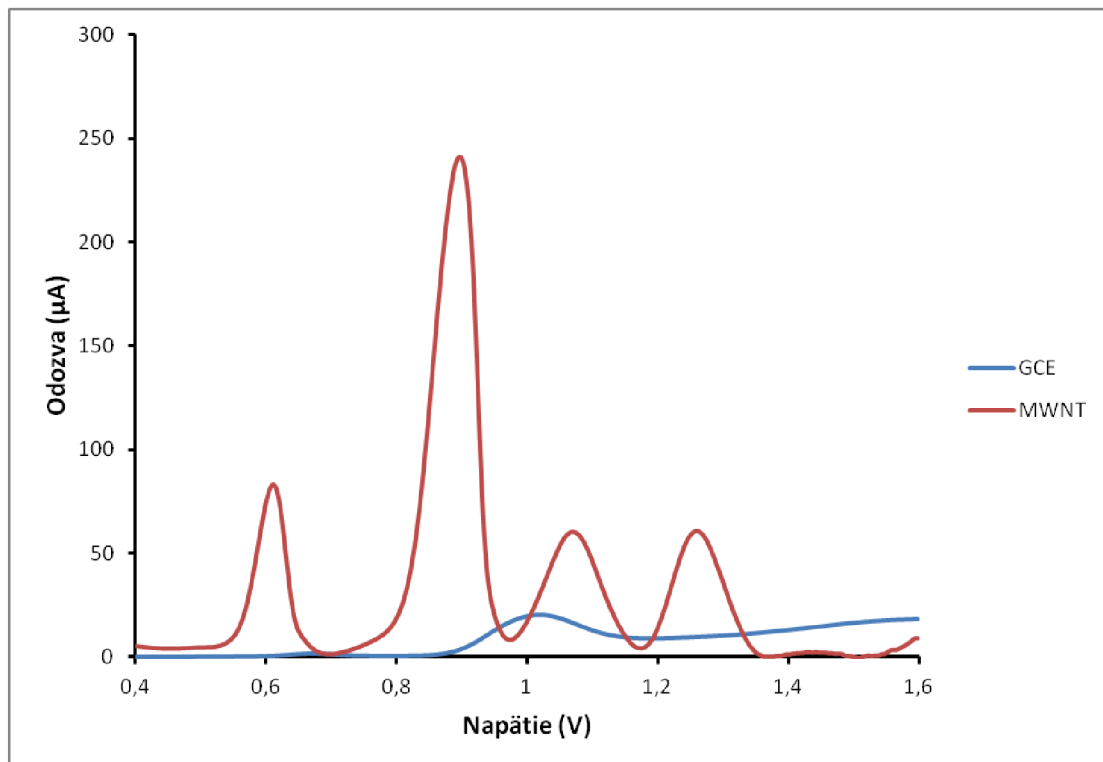
9 DISKUSIA

Cieľom mojej práce bolo vytvoriť taký biosenzor, ktorý bude schopný detekovať metylovanú DNA, na základe čoho bude možné tento epigenetický mechanizmus dostatočne študovať. Na to aby bol senzor/biosenzor dostatočne citlivý, bolo potrebné urobiť pred samou detekciou niekoľko nevyhnutných krokov. V prvom rade bolo za potreby dosiahnuť zvýšenie citlivosti elektródy určitým spôsobom modifikácie jej detekčného povrchu, nakoľko signál, ktorý je možné získať z elektródy nemodifikovanej je výrazne slabší a pomocou takejto elektródy nie je možné urobiť v podstate žiadnu analýzu.

9.1 Vplyv jednotlivých krokov úpravy GCE na výsledok

Z jednotlivých spôsobov a materiálov, ktoré je možné k modifikácií povrchu použiť som si vybral úpravu pomocou MWNTs a cholínu. Aplikovaná vrstva takýchto nanotrubic dokáže zvýšiť detekčnú citlivosť niekoľkonásobne. Postup úpravy povrchu zahŕňa zopár nevyhnutných krokov. V prvom rade je veľmi dôležité elektródu pred jej modifikáciou dôkladne vyčistiť, aby sa zamedzilo jednak znečisteniu jednotlivých vzoriek a jednak preto aby sme si do meraní nezanášali zbytočnú chybu. V takom prípade je niekedy pomerne zložitá a hlavne časovo náročná späťne vystopovať pôvod nepresností. Celý postup čistenia začína použitím aluminiového prášku, prostredníctvom ktorého sa elektróda leští na to určenom povrchu. Pri všetkých meraniach som používal rovnakú kombináciu hliníkovej a zamatovej leštiacej plochy. Doba leštenia je pomerne objektívny faktor, ktorý závisí predovšetkým na technike. Pri všetkých modifikáciách bola doba leštenia 90 sekúnd na každej ploche. Nasledovalo čistenie pomocou ultrazvuku, ktoré zbaví elektródu zvyškov prášku a posledných nečistôt. To prebieha v dvoch cykloch, kedy sa elektróda najprv čistí v etanole a následne v mili-q vode. Celý cyklus dokopy trvá 20 minút. Sušenie plochy po čistení je možné niekoľkými spôsobmi. Jednou možnosťou je nechať elektródu vysušiť voľne na vzduchu, čo je však časovo pomerne náročné a riskujeme tak že sa počas procesu opäť zanesie jej povrch. Efektívnym spôsobom sa javí vysušenie prúdom dusíku, ktoré nezaberie toľko času a nezvyšuje riziko znečistenia. Z týchto dôvodov som využíval tento spôsob. Po procese čistenia už nasleduje CV so šiestimi cyklami a samotná aplikácia MWNTs. Ich zasušovanie je opäť možné viacerými spôsobmi. Na začiatku som využíval sušenie prostredníctvom automatickej sušiarne. Tento proces však bol opäť časovo náročný a tým pádom neefektívny. Ideálnou náhradou bolo využitie infra lampy, pod ktorou tento proces trval približne 15 minút, čo prinieslo takmer dvojnásobné skrátenie času. Jednotlivé kroky boli počas celého experimentálneho plánu postupne optimalizované, tak aby boli časovo čo najmenej náročné. V konečnom dôsledku bol celý proces zkrátený približne o 25 – 30 minút bez vplyvu na merania.

Asi jedinou nevýhodou modifikácie elektród je skutočnosť, že takto upravená elektróda vydrží len jedno meranie, nakoľko sa vrstva MWNT počas merania natoľko znehodnotí, že nieje využiteľná pre opakovanie merania. Modifikáciu elektród je teda potrebné opakovať po každom meraní. V porovnaní s tým, ako je modifikácia účinná sa však jedná o akceptovateľný fakt



Obr. 29: Porovnanie záznamov bází modifikovanej a nemodifikovanej GCE

9.2 Optimalizácia metódy

Druhým nevyhnutným krokom pre dosiahnutie dostatočnej citlivosti pre detekciu jednotlivých báz bolo nájdenie optimálnych parametrov metódy. Pri zmenách hodnôt daného parametru sa tak sledoval ich vplyv na charakteristické vlastnosti signálu, ako sú výška a pološírka pík. Celému postupu je dostatočne venovaná časť v kapitole výsledky. Princíp optimalizácie spočíval v meraní rovnakého vzorku, teda zmesného roztoku báz v elektrochemickej cele. Koncentrácie jednotlivých báz sa počas meraní nemenili a bol použitý jeden konštantný zmesný roztok. Niektoré parametre mali len minimálny vplyv na vlastnosti signálu, predovšetkým na pološírku pík. Ako je však vidieť z priebehu grafov závislostí výšiek píku na danom parametre, táto vlastnosť pík sa podarila dostatočne maximalizovať.

9.3 Stanovenie jednotlivých báz a vzájomná interferencia

Na to, aby sa s určitou dalo konštatovať ktorý pík v signále odpovedá konkrétnej baze, bolo potrebné v prvom kroku zmerať jednotlivé bázy samostatne. Jednalo sa teda o päť roztokov danej bázy a elektrolytu – v tomto prípade 0,5 M fosfátový pufr o pH 7.0. Z voltamogramov sa tak následne dali s určitou dolo stanoviť pozície jednotlivých píkov, prípadne ich vzájomná interferencia. Z dosiahnutých výsledkov vyplíva, že jednotlivé potenciály pre guanín, adenín, tymín a cytozín v tomto poradí odpovedajú 0,68 V, 0,94 V, 1,16 V a 1,34 V. Z týchto hodnôt a zároveň z voltamogramov na obrázkoch č. 22 a 23 môžeme usúdiť, že jednotlivé báze medzi sebou neinterferujú a pri správnom nastavení metódy ich dokážeme kvantifikovať aj v zmesnom roztoku, prípadne pri nadväzujúcej detekcii oligonukleotidových sekvencií. Práve v tomto štádiu sa kladie veľký význam na predošlú optimalizáciu, predovšetkým pološírky píkov. Dosiahnutím čo najmenšej hodnoty pološírky sa tak zabezpečí ich presné stanovenie. Na základe testovania stability môžeme konštatovať, že každá jednotlivá elektróda si drží stabilitu merania pomerne dobre, ale jednotlivé sety elektród sa vzájomne líšia. Na základe nameraných hodnôt boli ďalej zhotovené kalibračné krivky

9.4 Stanovenie 5-metylcytozínu priamou detekciou

Prvým krokom k detekcii 5-mC bola opäť analýza interferencie s ostatnými bázami, aby sa v ďalšom kroku mohli pozorovať charakteristické vlastnosti píku na voltamograme. Z tohto dôvodu boli zhotovené 3 roztoky 5-mC, vždy s kombináciou inej bázy. Stanovenie interferencie s guanínom nebolo potrebné uskutočniť, nakoľko jeho potenciál je od potenciálu prislúchajúceho 5-mC na voltamograme dostatočne vzdialený. Jednotlivými meraniami sa zistilo, že adenín a cytozín nemá vplyv na pík 5-mC. Hlavná výzva však spočívala v odlíšení 5-mC od tymínu, s ktorým tieto dve bázy zdieľajú veľmi podobný potenciál. Na voltamograme tak vzniká tzv. dvojpík, ktorý je tvorený interferenciou práve týchto dvoch báz. Stanovenie 5-mC jednoduchým odočtom z voltamogramu tak nieje možné. Aby sme s určitou mohli konštatovať, že tento dvojpík je skutočne tvorený aj 5-mC, zmerali sme roztoky tymínu a 5-mC v rôznych pomeroch (1:1, 1:5 a 5:1). Rôzne pomery koncentrácie mali za následok charakteristický trend v zmene tvaru prekrývajúceho sa signálu, podľa aktuálnej koncentrácie jednej, alebo druhej bázy. Na základe tohto trendu sme potvrdili prítomnosť 5-mC. Ďalším krokom stanovenia bolo využitie metódy tzv. „curve fittingu“ ako numerického algoritmu na získaný signál. Výhodou tejto metódy je možnosť pomocou vytvorených píkov s gausovskými vlastnosťami skladať umelo vytvorený signál a približiť sa tak, alebo úplne napodobniť tvar obálky nameraného signálu. Využitie samotného algoritmu bez predchádzajúcej analýzy by však nemal význam, pretože akýkoľvek tvar signálu dokážeme umelo vytvoriť dostatočným množstvom použitých kriviek.

Vo všeobecnosti teda platí, že čím menej kriviek je na vytvorenie požadovaného tvaru signálu použitých, tým sa zvyšuje predpoklad na korektnú analýzu.

Práve z tohto dôvodu bolo potrebné poznať vzájomný vplyv jednotlivých zložiek charakteristický trend v zmene tvaru pri rôznych pomeroch oboch zložiek. Z meraní je zrejmé, že tvar krivky na hodnote potenciálu, kde by sa mali teoreticky nachádzať obidve bázy, má taký tvar, ktorý nedokážeme napodobniť len jednou gausovou krivkou. To nám napovedá o prítomnosti minimálne ďalšej jednej zložky. Pokiaľ teda dokážeme napodobniť tvar obálky použitím maximálne dvoch kriviek, tak na základe predchádzajúcich stanovení pozícií jednotlivých báz dokážeme s určitou istotou potvrdiť, že sa na danom mieste nachádza 5-mC. Voltamogramy a ukážky z postupu curve fittingu v kapitole Výsledky túto skutočnosť potvrdzujú.

9.5 Stanovenie 5-metylcytozínu pomocou biosenzoru

Poslednou časťou experimentálneho plánu bolo stanovenie 5-metylcytozínu v rôznych oligonukleotidových sekvenciách. Základná predstava detekcie vychádzala z vyššie diskutovaných postupov. Boli tak použité rovnaké optimalizované parametre, aj rovnaký spôsob modifikácie elektródy. Základným rozdielom v stanovení metylácie biosenzorom spočíva v princípe detekcie. Podstatou je použitie oxidovaných MWNTs a inkubácia próby na takto modifikovanú elektródu po určitú dobu. Následne sa hybridizuje cieľová sekvencia, v ktorej sa metylácia stanovuje. V tomto experimentálnom pláne boli vyskúšané dva spôsoby inkubácie próby (podkapitola 7.8). Avšak druhá spomenutá metóda nevykazovala dostatočný signál (takmer 80% pokles signálu) a v porovnaní s prvou – použitou metódou, sa pre náš prípad javila ako nepoužiteľná. Z toho dôvodu je v práci táto metóda síce spomenutá ako vyskúšaná, no nie sú prezentované žiadne výsledky.

Prvou metódou boli detekované tri typy sekvencií s rôznym podielom metylovaných cytozínov. V prvom prípade sa jednalo o sekvenciu bez 5mC, v druhom o polovičný obsah metylovaných cytozínov voči nemetylovaným a v poslednej boli všetky cytozíny v sekvencií metylované. Jednotlivé vzorky boli zmerané v koncentráciách 100 μ M a 50 μ M. Jednotlivé zastúpenie 5-mC v sekvencií predstavuje paralelu s princípom použitým v metóde priamej detekcie, kde sa sledovali zmeny krivky pri rôznych pomeroch. Aj v tomto prípade môžeme na odpovedajúcom mieste vidieť (Obr.28) tri rozdielne priebehy signálu, čo indikuje prítomnosť viacerých zložiek (píkov). Tento predpoklad jasne deklarujú všetky voltamogramy po aplikácii curve fittingu, na základe čoho môžeme opäť konštatovať prítomnosť 5-mC.

9.6 Porovnanie metód

S predchádzajúcej diskusie vyplýva, že obe predstavené metódy sa líšia predovšetkým v spôsobe detekcie. Metóda priamej detekcie vyniká oproti biosenzoru svojou rýchlosťou a jednoduchším prevedením. Fakt, že nieje potrebná inkubácia a následná hybridizácia cieľovej sekvencie, značne kráti časovú náročnosť detekcie. Významným negatívnym faktorom však je, že počas celého experimentálneho plánu sa nepodarilo pri tomto spôsobe detekcie dosiahnuť takú úroveň citlivosti, aby bolo možné detekovať metyláciu v oligonukleotidových sekvenciách, ale len v zmesných roztokoch bází. Detekcia biosenzorom ťaží v mechanizme hybridizácie cieľovej sekvencie s próbou, čo značne zvyšuje špecifickosť detekcie. Tým, že pri priamej detekcii sa tento proces nevykonáva, celá metóda je značne závislá na úspešnej modifikácii elektródy. Tá je z veľkej miery založená na manuálnej práci s elektródou, predovšetkým nanosenie dostatočného a stále rovnakého objemu MWNT je náročná úloha. Zasušenie a tak aj celá modifikácia môže byť významne ovplyvnená ľudským faktorom.

Vyššiu časovú náročnosť prípravy detekcie biosenzorom vynahrádza táto metóda vo vyššej citlivosti a lepšej opakovateľnosti. Výhodou je použitie oxidovaných MWNTs, ktoré sa špecificky viažu s próbou. Tým sa vytvorí ideálny základ pre úspešnú hybridizáciu cieľovej sekvencie. Pomocou vhodnej modifikácie a vyoptymalizovanej metóde som tak vytvoril biosenzor, ktorý bol schopný detekovať prítomnosť 5-mC v oligonukleotidových sekvenciách. Pri štúdií metylácie DNA je odlíšenie píkov odpovedajúcich metylovanej forme cytozínu od ostatných najdôležitejším krokom. Navrhnutý a popísaný postup túto problematiku dokáže riešiť dostatočne efektívne, na základe čoho môžeme usúdiť, že daný postup detekcie 5-mC sa v tomto prípade javí ako vhodný.

10 ZÁVER

Hlavnou témou tejto diplomovej práce bolo vyrobenie citlivého senzoru a biosenzoru pre štúdium metylácie DNA. Na základe toho bola celá práca rozdelená do jednotlivých blokov, ktoré postupne viedli k tomuto cieľu. V prvej časti experimentálneho plánu som sa venoval modifikácií detekčného povrchu GCE. K tomu, aby som dosiahol zvýšenie citlivosti elektródy som sa na základe odbornej literatúry rozhodol použiť kombináciu cholínového filmu a MWNTs. Takto modifikovaná elektróda vykazuje vhodné elektrochemické vlastnosti, ktoré boli základom pre úspešnú detekciu. V nadväzujúcom bloku nasledovala optimalizácia metódy detekcie. V rámci tejto práce som využíval detekciu pomocou diferenčnej pulznej voltametrie. Bolo tak nutné nastaviť všetky vstupné parametre metódy nájdením ich optimálnych hodnôt. Výsledkom sú optimalizované hodnoty, ktoré som následne použil pri oboch spôsoboch detekcie.

V ďalšej časti som sa venoval metóde priamej detekcie. Pomocou DPV som najskôr detekoval jednotlivé bázy v elektrolyte a následne som študoval ich vzájomnú interferenciu s 5-mC. Na základe stanovenej interferencie 5-mC s tymínom je potrebné tieto dve zložky od seba odlíšiť. Na odlíšenie prítomného dvojpíku som sledoval trend v zmene tvaru signálu v závislosti na rôznych pomeroch tymínu a 5-mC v zmesnom roztoku. Na základe vyniknutých voltamogramov a vedomosti o pozícií oboch píkov na voltamograme som mohol konštatovať že prítomný dvojpík je jednoznačne kombináciou týchto dvoch báz. K odlíšeniu 5-mC od tymínu som využil numerický algoritmus na báze tzv. „curve fittingu“ pomocou programu MagicPlot. Pomocou tejto metódy som bol schopný odlíšiť 5-mC v zázname zo zmesného vzorku bází. Pre stanovenie metylácie v sekvencií konkrétneho oligonukleotidu však prezentovaná metóda priamej detekcie nebola dostatočne citlivá.

V poslednej časti som sa venoval detekcií 5-mC pomocou biosenzoru. Na detekciu som použil tri rôzne modifikácie rovnakej oligonukleotidovej sekvencie s rozdielnym pomerom metylovaných a nemetylovaných cytozínov. Na základe zmeny v tvare signálu a numerického algoritmu som tak dokázal opäť stanoviť jednoznačnú prítomnosť 5-mC v sekvencií s 50% obsahom a 100% obsahom metylovanej formy cytozínu. Výsledkom tak je úspešná detekcia 5-metylcytozínu v reálnych oligonukleotidových sekvenciách o koncentrácií 100 μM a 50 μM

Literatúra

- [1] Rauch, T. A, Wu, X., Zhong, X., Riggs, A. D., and Pfeifer, G.P.(2009). *A human B cell methylome at 100-base pair resolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- [2] Holliday, R.. (1987). *The Inheritance of epigenetic defects*. Science 238, 163-170
- [3] Surani, M.A.H., Barton, S. C., and Norris, M.L. (1984). *Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis*. Nature 308, 548–550
- [4] Goldberg, A. D., (2007). *Epigenetics: A landscape takes shape*. Cell, Volume 128, Issue 4, 635-638
- [5] Hermann, A., H. Gowher, et al. (2004). *Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases*. Cell Mol Life Sci 61(19-20): 257187
- [6] Reik, W., W. Dean, et al. (2001). *Epigenetic reprogramming in mammalian development*. Science 293(5532): 1089-93.
- [7] Okano, M., D. W. Bell, et al. (1999). *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell 99(3): 247-57
- [8] Hinshelwood, R. A., J. R. Melki, et al. (2009). *Aberrant de novo methylation of the p16INK4A CpG island is initiated post gene silencing in association with chromatin remodelling and mimics nucleosome positioning*. Hum Mol Genet 18(16): 3098-109.
- [9] Klimasauskas, S., S. Kumar, et al. (1994). *HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix*. Cell 76(2): 357-69
- [10] Turek-Plewa, J. and P. P. Jagodzinski (2005). *The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression*. Cell Mol Biol Lett 10(4): 631-47.
- [11] Bestor, T. H. (2000). *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet 9(16): 2395-402
- [12] Medvedeva, Y. A., M. V. Fridman, et al. *Intergenic, gene terminal, and intragenic CpG islands in the human genome*. BMC Genomics 11: 48.
- [13] Goll, M. G. and T. H. Bestor (2005). *Eukaryotic cytosine methyltransferases*. Annu Rev Biochem 74: 481-514.
- [14] Margot, J. B., A. M. Aguirre-Arteta, et al. (2000). *Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure*. J Mol Biol 297(2): 293-300
- [15] Rottach, A., H. Leonhardt, et al. (2009). *DNA methylation-mediated epigenetic control*. J Cell Biochem 108(1): 43-51.
- [16] Kareta, M.S., Botello, Z.M., Ennis, J.J., Chou, C., and Chédin, F. (2006). *Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L*. J. Biol. Chem. 281, 25893–25902.
- [17] Chen, Z.-X., Mann, J.R., Hsieh, C.-L., Riggs, A.D., and Chédin, F. (2005). *Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family*. J. Cell. Biochem. 95, 902–917.
- [18] Borodovsky, A., Salmasi, V., Turcan, S., Fabius, A.W.M., Baia, G.S., Eberhart, C.G., Weingart, J.D., Gallia, G.L., Baylin, S.B., Chan, T.A., et al. (2013). *5-azacytidine reduces methylation, promotes differentiation and induces tumor*

- regression in a patient-derived IDH1 mutant glioma xenograft. Oncotarget 4, 173-71747.*
- [19] Aceituno F. F, Moseyko N., Rhee S.Y., Gutierrez R.A.(2008). *The rules of gene expression in plants: organ identity and gene body methylation are key factors for regulation of gene expression in Arabidopsis thaliana.* BMC Genomics.
- [20] Mathieu O., Reinders J., Caikovski M., Smathajitt C., Paszkowski J.(2007). *Transgenerational stability of the Arabidopsis epigenome is coordinated by CG methylation.* Cell 851-862.
- [21] Robertson K.D., Wolffe A.P.(2000). *DNA methylation in health and disease.* Nat Rev Genet, 11-19.
- [22] Ghoshal K., Bai S.(2007). *DNA methyltransferases as targets for cancer therapy.* Drugs Today (Barc), 395-422.
- [23] Beisler J. A.(1978). *Isolation, characterization, and properties of a labile hydrolysis product of the antitumor nucleoside, 5-azacytidine.* J Med Chem, 204-208.
- [24] Fraga M.F., Esteller M.(2002). *DNA methylation: a profile of methods and applications.* Biotechniques. 636-649.
- [25] Shen L., Waterland R.A.(2007). *Methods of DNA methylation analysis.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care 576-581.
- [26] Nelson M., Raschke E., McClelland M.(1993). *Effect of site-specific methylation on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases.* Nucleic Acids Res. 3139-3154.
- [27] Fojtova M., Kovarik A., Votruba I., Holy A.(1998). *Evaluation of the impact Of S-adenosylhomocysteine metabolic pools on cytosine methylation of the tobacco genome.* Eur J Biochem., 347-352.
- [28] Mikeska T., Candiloro, Dobrovic A. (2010). *The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation.* Epigenomics 2010, 561-573.
- [29] Rogers Y. H., Venter J. C.(2005). *Genomics: massively parallel sequencing.* Nature, 326-327.
- [30] Klouda, P. *Fyzikální chemie.* Ostrava: Pavel Klouda, 2002. 140 s. ISBN: 80-86369-06-4
- [31] Stránska, Eva. *Redoxní děje* [online]. leden 2010. Dostupné z WWW: www.gvi.cz/files/chemie/rd.pdf.
- [32] Masarykova univerzita. Fakulta přírodovědecká. Ústav chemie. *Elektrody* [online]. Dostupné z WWW: <http://cheminfo.chemi.muni.cz/ianua/ZFCh/elektrochem.htm>
- [33] *Elektrochemie* [online]. Dostupné z WWW: http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/obec_chem/obecna_chemie_skripta_7.doc.
- [34] Barek, J., Opekar, F., Štuhlík, K., *Elektroanalytická chemie.* Praha: Karolinum, 2005. 188 s. ISBN 80-246-1146-5
- [35] Barek, J., Opekar, F., Štulík, K., 2005, *Elektroanalytická chemie,* Karolinum, Praha
- [36] Skoog, D. A., West, D. M., et al. *Fundamentals of analytical chemistry.* 9th ed. United Kingdom: Brooks/Cole Cengage learning, 2013.

- [37] Wilder, J. W. G., Venema, L. C., Rinzler, A. G., Smalley, R. E., Dekker, C.: *Electronic Structure of Atomically Resolved Carbon Nanotubes*, Nature, 1998.
- [38] Lhoták, P. *Chemie fullerenů*, Ústav Organické Chemie, VŠCHT Praha, Dostupné na WWW: http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/7_Lhotak.pdf
- [39] *Voltametrie a polarografie* [online]. Dostupné z WWW: <http://www.natur.cuni.cz/~opekar/elgeoch/elgeoch3.doc>
- [40] Palecek, E., Fojta, M., *Electrochemical DNA Sens.*, In: Wilner, I., and Katz, E. (eds) *Bioelectronics*, Wiley VCH, Weinheim.
- [41] Canov, M., *Polarografie* [online]. 2010. Dostupné na WWW: <http://jergym.heidu.cz/~canovm/analchem/polar.htm> .
- [42] University of Cambridge. Department of Chemical Engineering and Biotechnology. *Linear Sweep and Cyclic Voltametry: The Principles* [online]. 2011. Dostupné na WWW: <<http://www.ceb.cam.ac.uk/pages/linear-sweep-and-cyclic-voltametry-the-principles.html>>
- [43] Jiménez, L. L.: *Carbon Nanotube Polymer Composites: Mechanical, Electrical and Photorefractive Properties*, Chalmers university of technology. 2007. ISBN 978- 91-7291-937-2.
- [44] Pohanka, M., Skladal, P., *Piezoelectric immunosensor for Francisella tularensis detection using immunoglobulin M in a limiting dilution*. Anal. Lett., 2005. Roč. 38. č. 3, s. 411-422.
- [45] ZHAO, W-W, Jing-Juan XU a Hong-Yuan CHEN. *Photoelectrochemical bioanalysis: the state of the art*. *Chem. Soc. Rev* [online]. 2015, 44(3), 729-741 [cit. 2017-01-04]. DOI: 10.1039/C4CS00228H. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4CS00228H>
- [46] ZHAO, Wei-Wei, Jing-Juan XU a Hong-Yuan CHEN. *Photoelectrochemical DNA Biosensors*. *Chemical Reviews* [online]. 2014, 114(15), 7421-7441 [cit. 2017-01-04]. DOI: 10.1021/cr500100j. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr500100j>
- [47] WANG, P, Hanbin CH., Jiuying T., Zong D. a Xiaoyong Z.. *Electrochemical evaluation of DNA methylation level based on the stoichiometric relationship between purine and pyrimidine bases*. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2013, 45, 34-39 [cit. 2017-01-04]. DOI: 10.1016/j.bios.2013.01.057. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566313000687>

Zoznam veličín, symbolov a skratiek

CNTs – Carbon nanotubes

CV – cyclic voltammetry

DNA – deoxyribonucleic acid

DNMT – DNA methyltransferase

DPV – differential pulse voltammetry

dsDNA – double strand deoxyribonucleic acid RNA – ribonucleic acid

GCE – glassy carbon electrode

HPCE - High-Performance Capillary Electrophoresis [V] – Volt

HPLC – high-performance liquid chromatography

Ch – Cholín

[J] – Joule

[K] – Kelvin

MWNTs – multi-walled nanotubes

PEC – photoelectrochemistry

ssDNA – single strand deoxyribonucleic acid

SWNTs – Single-walled nanotubes

SWV – squarewave voltammetry

[V] – Volt

[μ A] – mikro ampér