

SPOLEČNĚ PRO VÝZKUM, ROZVOJ A INOVACE
CZ/FMP.17A/0436



Poškození nukleových kyselin a technologické přístupy pro jejich detekci

Lukáš Nejdl

09. 04. 2015

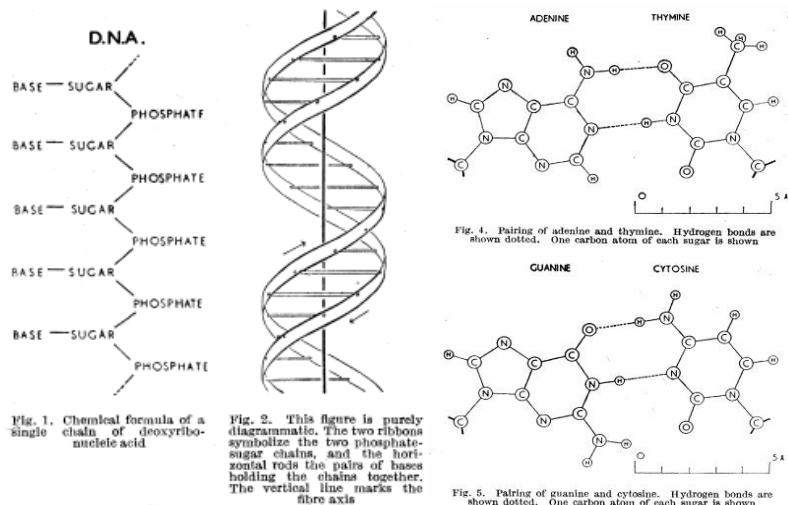
Laboratoř metalomiky a nanotechnologií, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1,
Hvězdárna Valašské Meziříčí – SpaceShow 2



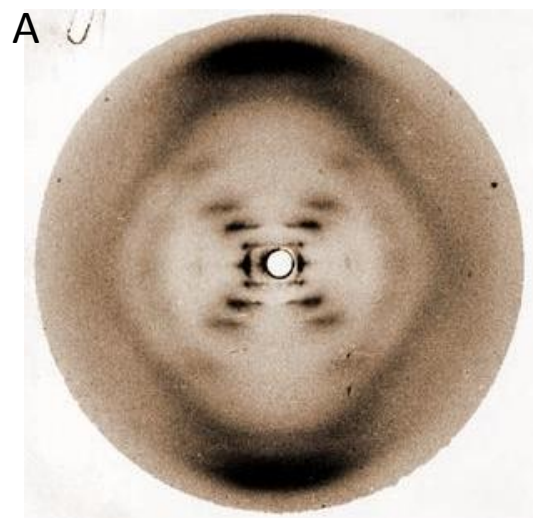
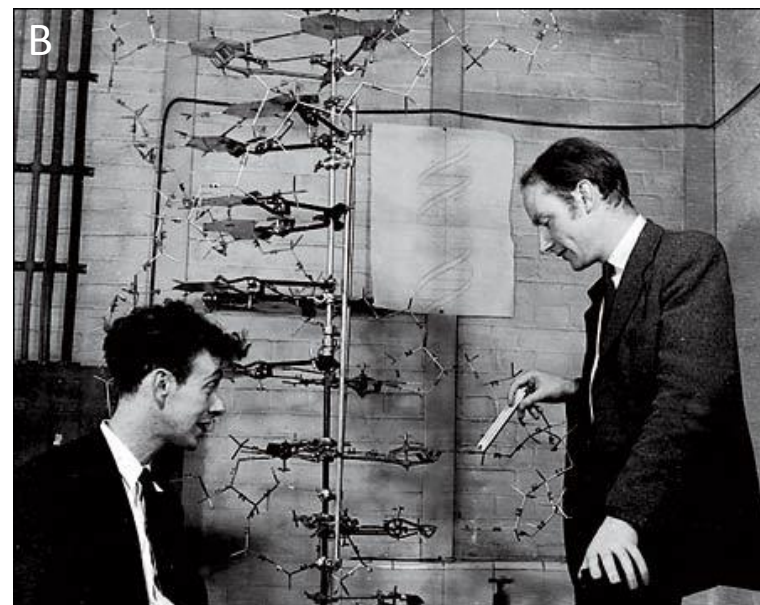
FOND MIKROPROJEKTŮ

HISTORIE DNA

A No. 4361 May 30, 1953 NATURE



Obr.1: (A) První správný návrh DNA, vytvořený **(B)** Watsonem a Crickem



Obr. 2: Rentgenová difrakční fotografie DNA, kterou vytvořila **(B)** Rosalinda Franklinová

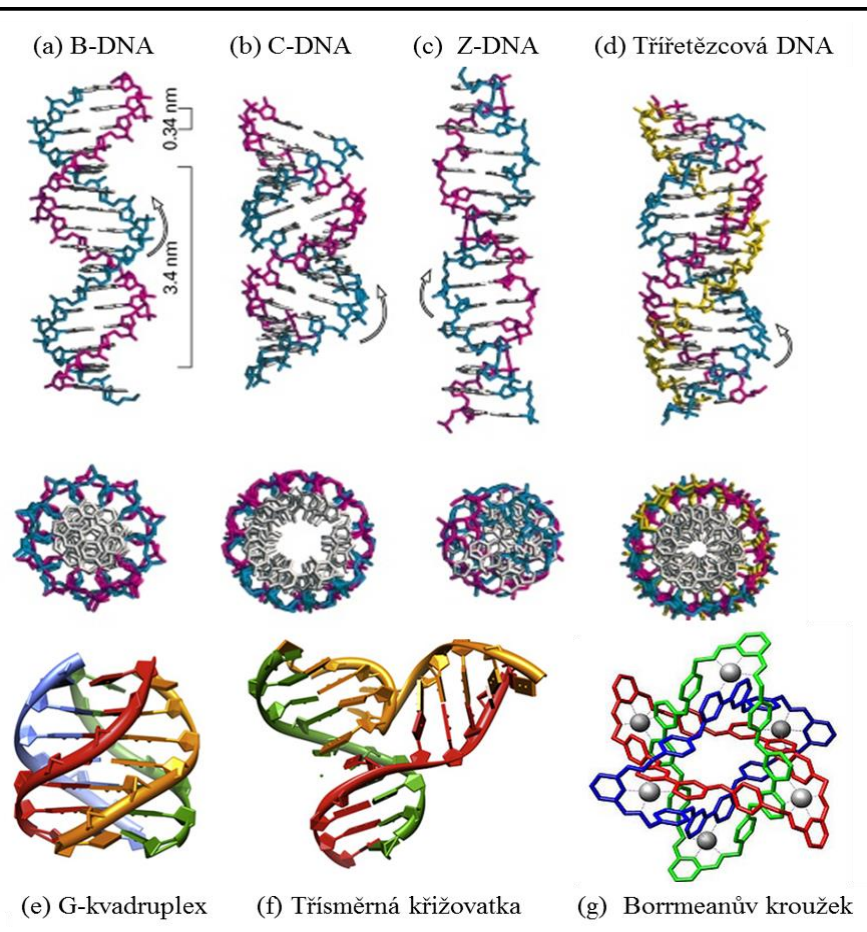
- Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je tvořena z navzájem spletených **řetězců nukleotidů**, které jsou složeny z **cukru deoxyribózy, fosfátové skupiny** a jedné ze **čtyř nukleových bází** (adeninu - **A**, guaninu- **G**, cytosinu - **C** a thyminu - **T**), mezi kterými se vytváří **vodíková vazba**

Literatura

Obr. 1 A: Watson, J.D. and F.H.C. Crick, Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 1953. 171(4361): p. 964-967.

Obr.2 A: Franklin, R.E. and R.G. Gosling, *Molecular configuration in sodium thymonucleate*. *Nature*, 1953. 171(4356): p. 740-741.

STRUKTURY DNA

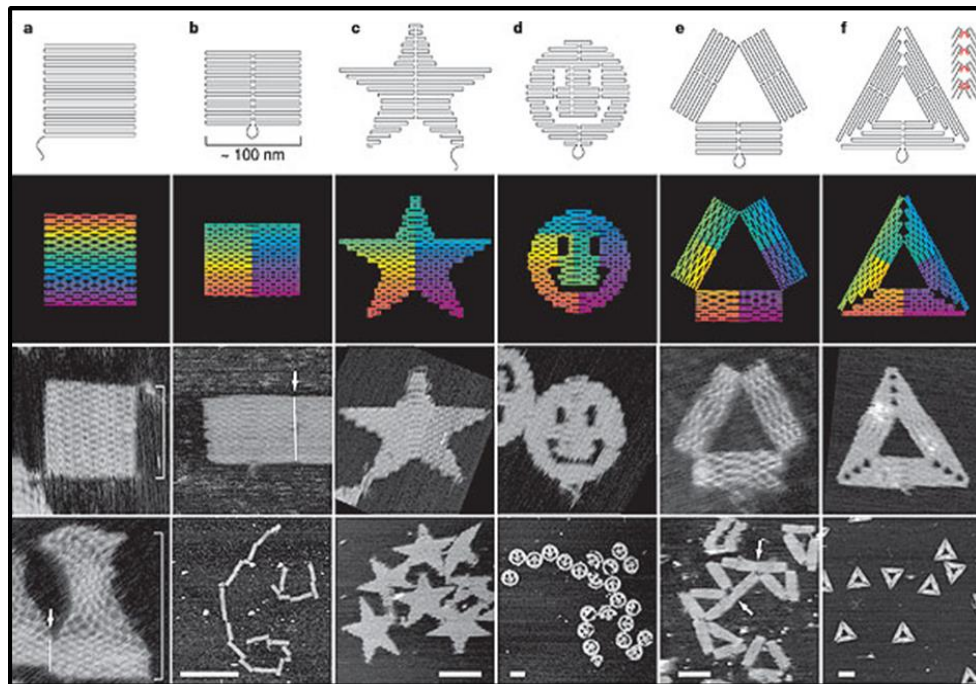


Obr.1: Různé struktury DNA

Literatura

Obr.1: Garcia-Ramos, J.C., et al., *Metal-Based Drug-DNA Interactions*. Journal of the Mexican Chemical Society, 2013. 57(3): p. 245-259, Chichak, K.S., et al., *Molecular Borromean rings*. Science, 2004. 304(5675): p. 1308-1312., Duckett, D.R., et al., *The structure of the holliday junction, and its resolution*. Cell, 1988. 55(1): p. 79-89

Obr. 2: Rothmund, P.W.K., *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*. Nature, 2006. 440(7082): p. 297-302



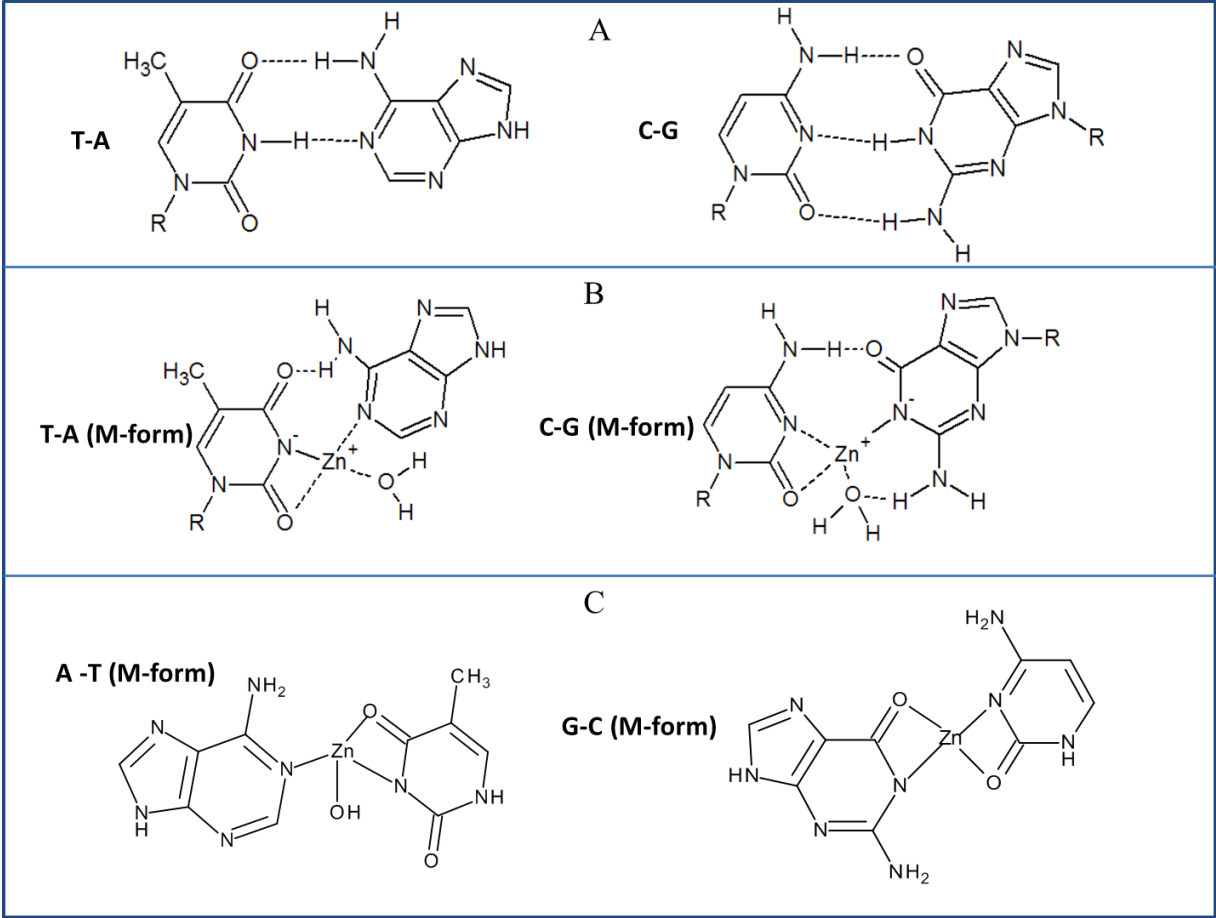
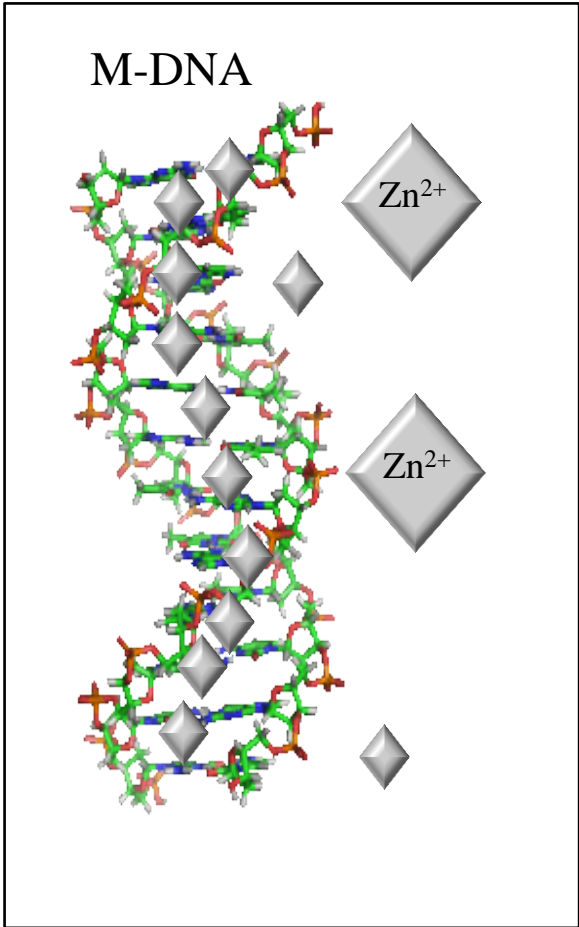
Obr. 2: Prostorové DNA útvary (origami), složený z více jak 200 krátkých oligonukleotidů. Výsledný útvar má v průměru přibližně 100 nm, **a** = čtvercové plochy, **b** = obdélníky, **c** = hvězdy, **d** = emotikony, **e** a **f** = různé typy trojúhelníků

B-DNA – PRAVOTOČIVÁ

C-DNA – PRAVOTOČIVÁ

Z-DNA – LEVOTOČIVÁ

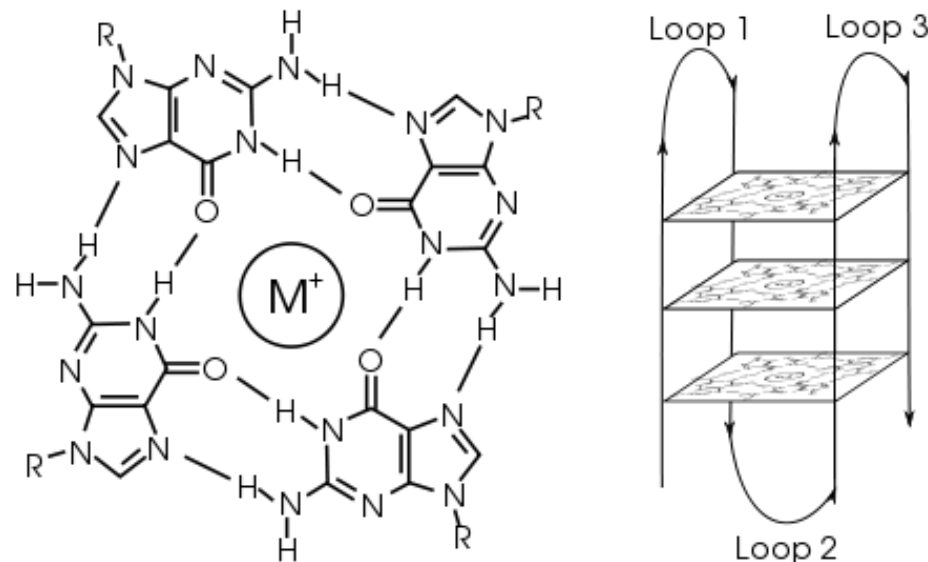
Struktury DNA: M-DNA



M – DNA = DNA se začleněným kovovým iontem do středu dvoušroubovice. Poprvé byla tato struktura pojmenována v roce 1993

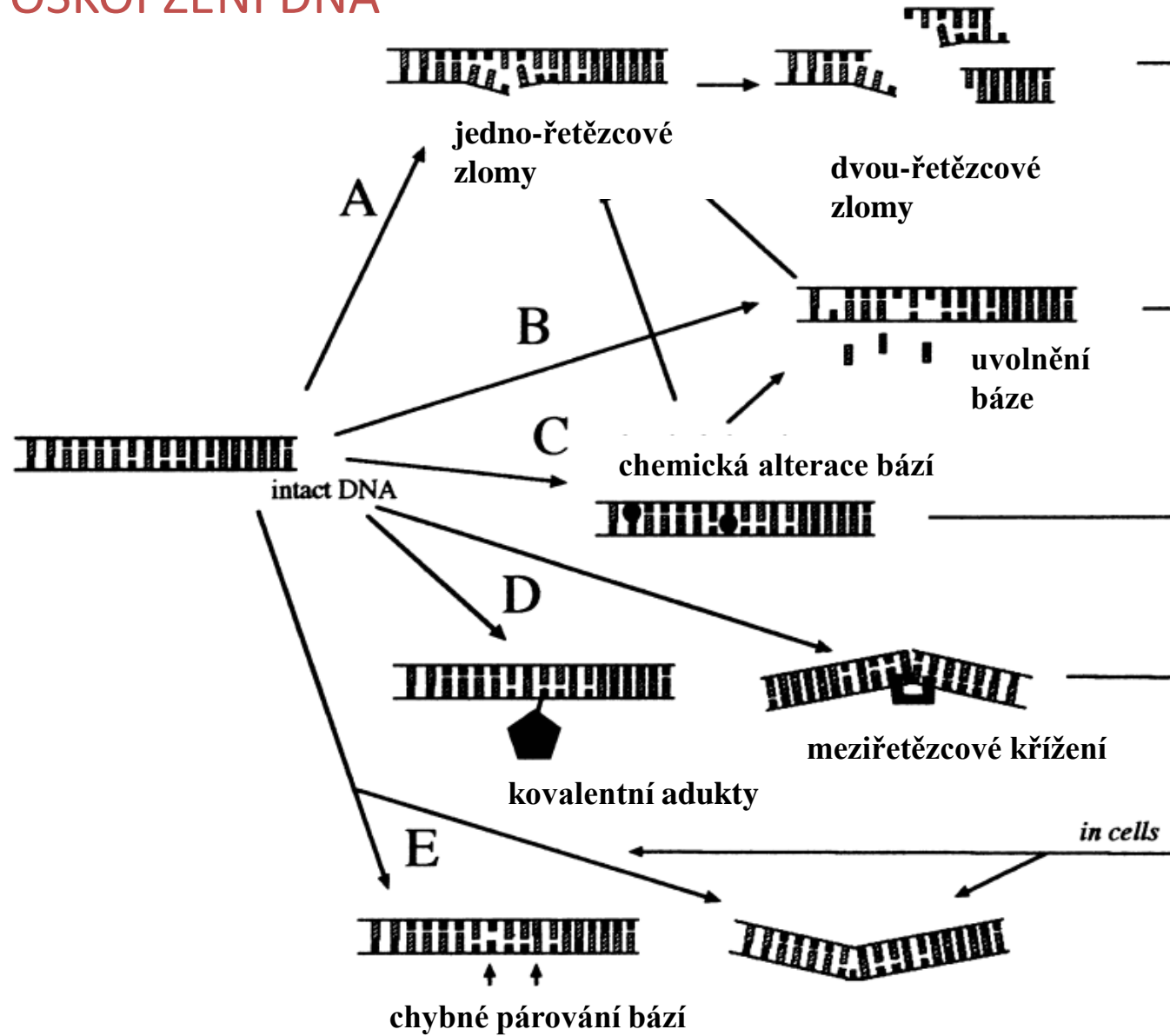
Struktury DNA: G- kvartet x G - kvadruplex

- G-kvartet (též guaninový kvartet nebo G-tetráda) je rovinný systém čtyř guaninových bází, navzájem pootočených o 90° a pospojovaných vodíkovými můstky
- G-kvartety jsou běžně k nalezení v GC-bohatých oblastech RNA, ale i v DNA (především v promotorových oblastech některých genů, na koncích telomer)
- Vyskytuje-li se nad sebou několik G-kvartetů, útvar se označuje jako G-kvadruplex



G – kvartet a G - kvadruplex

TYPY POŠKOPZENÍ DNA

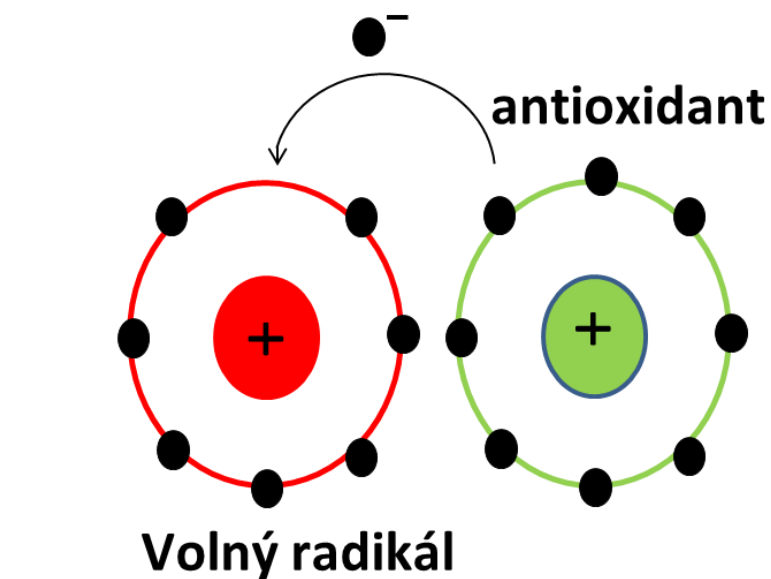
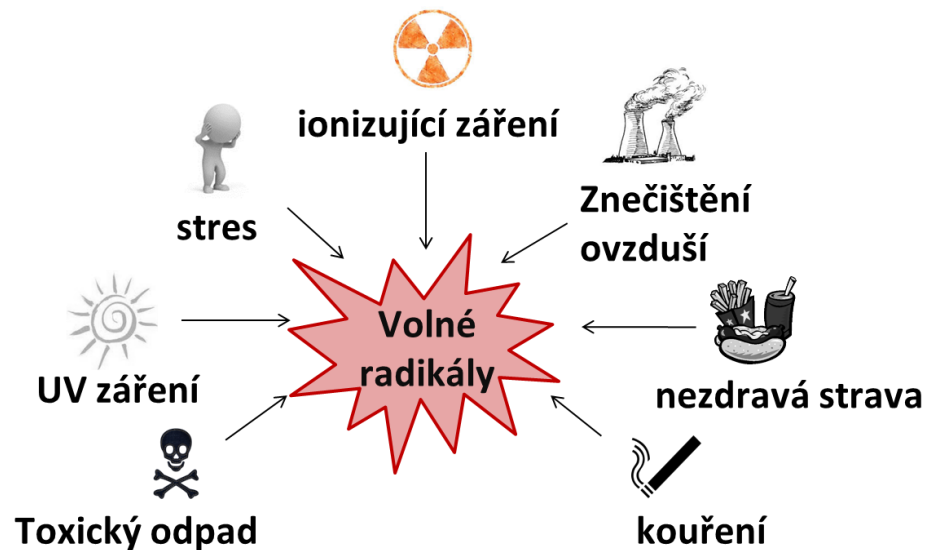


Literatura

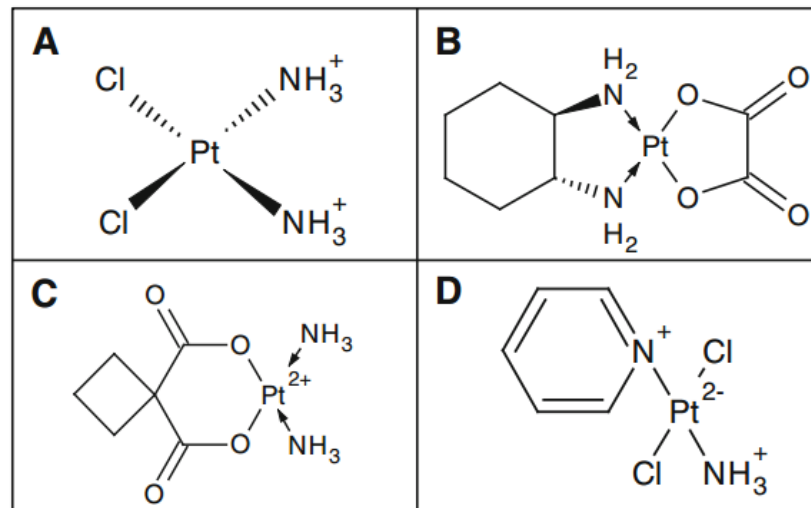
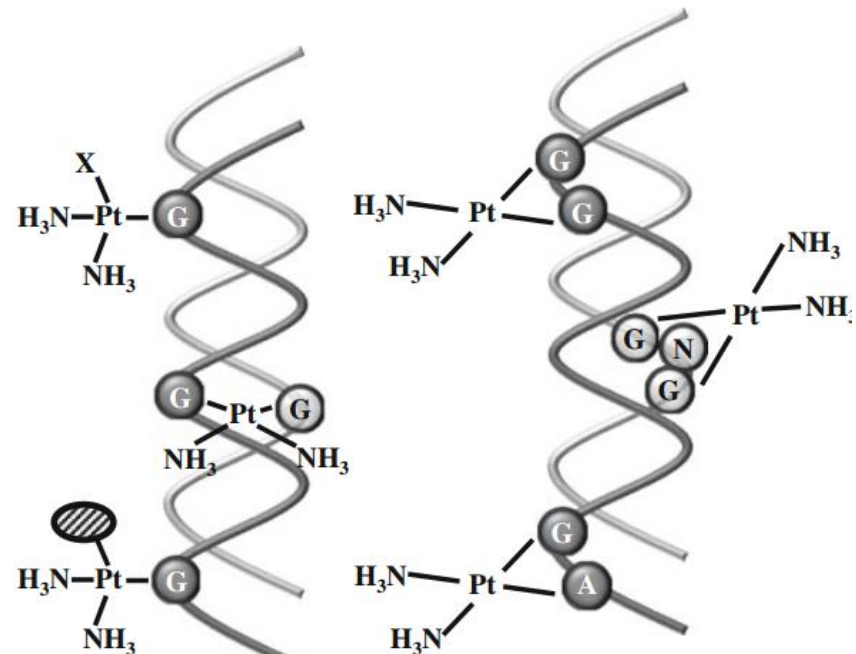
Fojta M: Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis* 2002, 14(21):1449-1463.

POŠKOZENÍ DNA

Poškození DNA vyvolané volným radikálem



Poškození DNA vyvolané chemickou látkou



Vizualizace DNA: UV/VIS Spektrofotometrie

- Díky purinovým zbytkům má čistá DNA absorpční maximum při 260 nm, přičemž přibližně platí, že absorbanci 1 má roztok DNA o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Johann Heinrich Lambert (1728–1777)

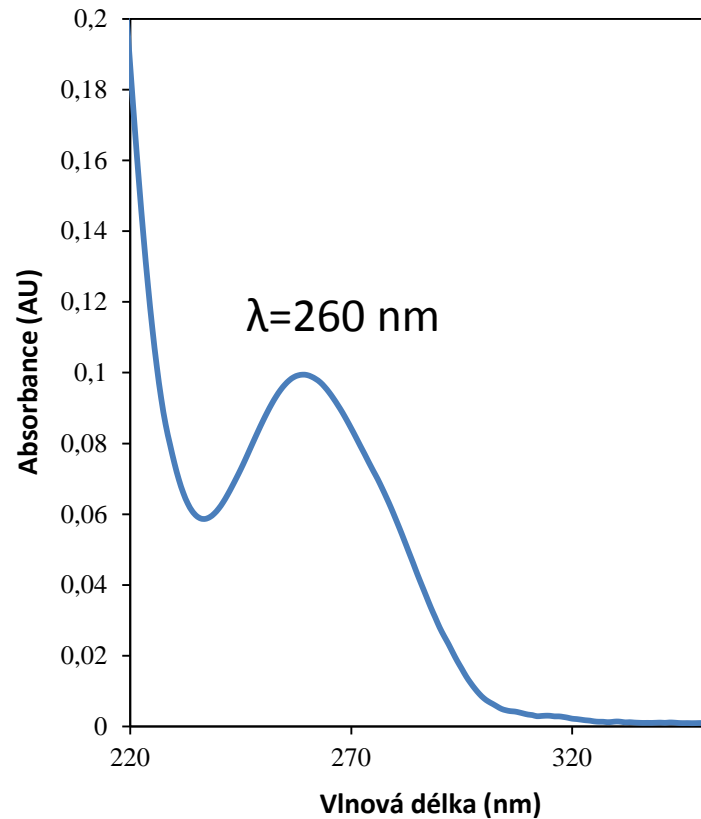
- Lambert zjistil, že vztah mezi optickou dráhou (tloušťka absorbující vrstvy) a transmitancí je exponenciální, což vedlo k zavedení veličiny **absorbance**

August Beer (1825–1863)

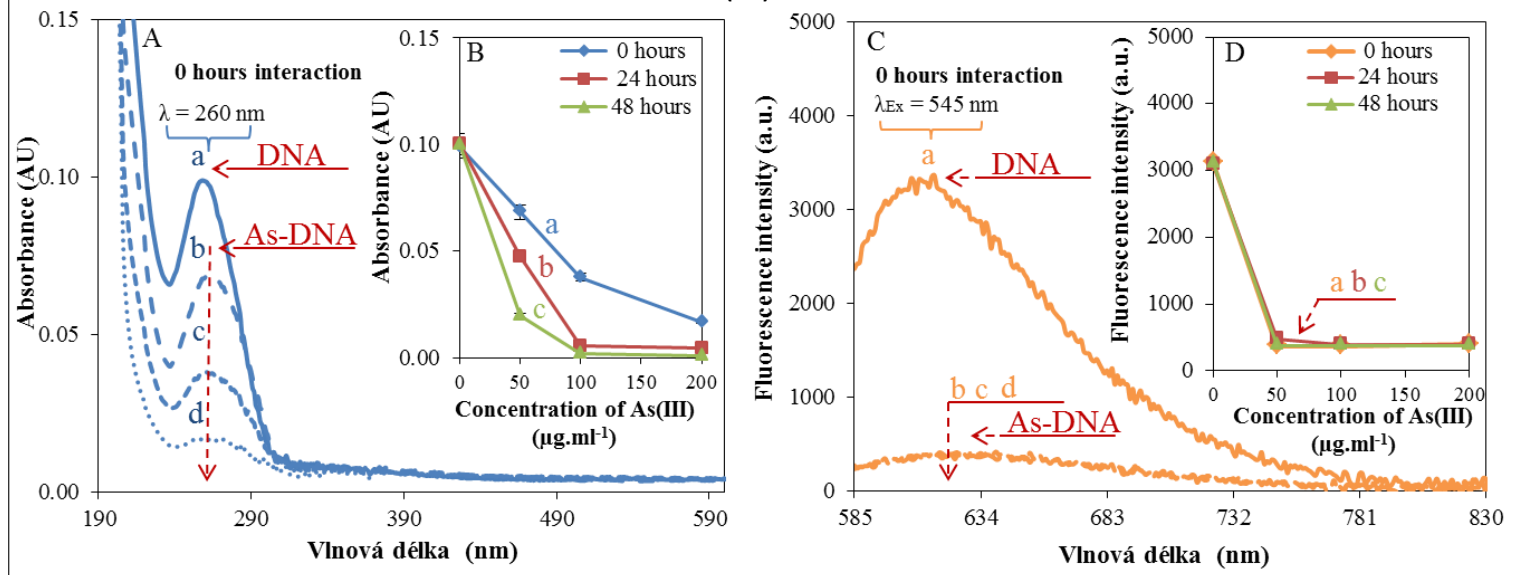
- Beer prokázal, že absorbance je lineární funkcí koncentrace absorbující látky

Lambertův-Beerův zákon

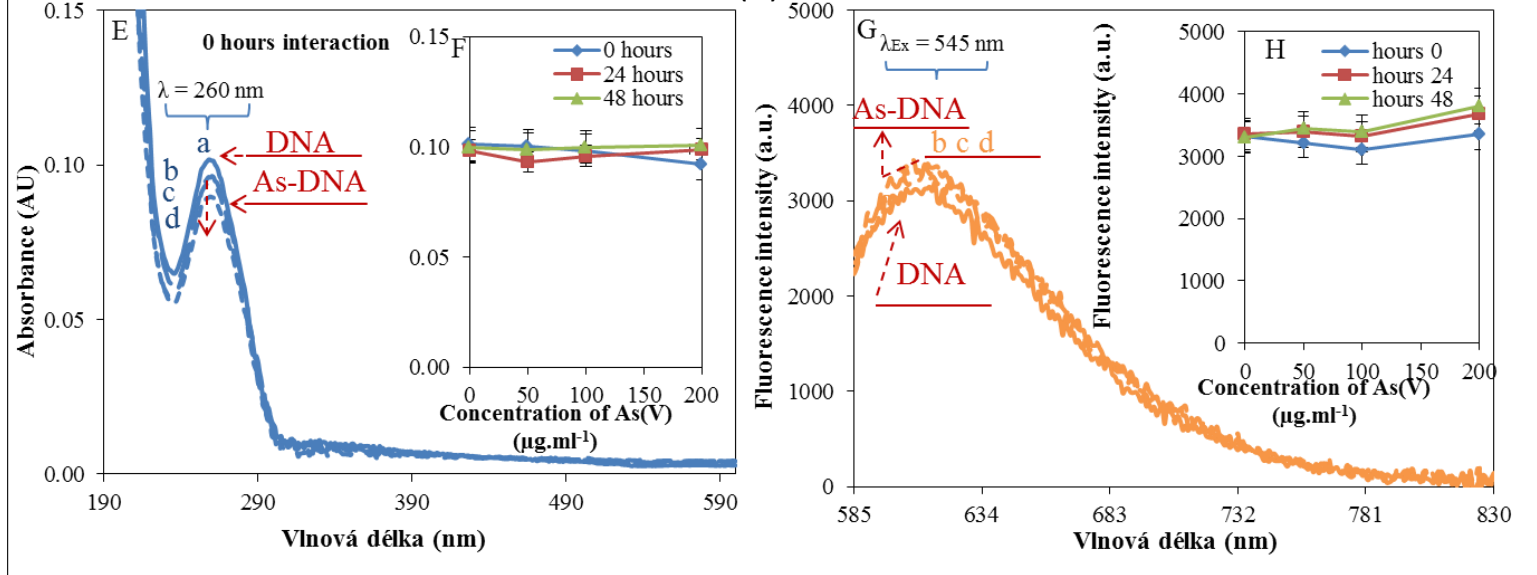
- **Absorbance je přímo úměrná optické dráze a koncentraci absorbující látky**



Vliv As(III) na DNA



Vliv As(V) na DNA



Vizualizace DNA: Elektroforéza

Princip elektroforézy

- Od roku 1892 je známo, že anorganické částice v koloidním roztoku působením elektrického pole nenáhodně putují. Zanedlouho poté byl tento jev popsán i u proteinů ve vodných roztocích
- V roce 1948 získal za sestavení elektroforetické aparatury NC za chemii švédský vědec Arne W. Tiselius.
- Elektroforéza využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli, přičemž rychlost pohybu částic je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku.

Rozdělení

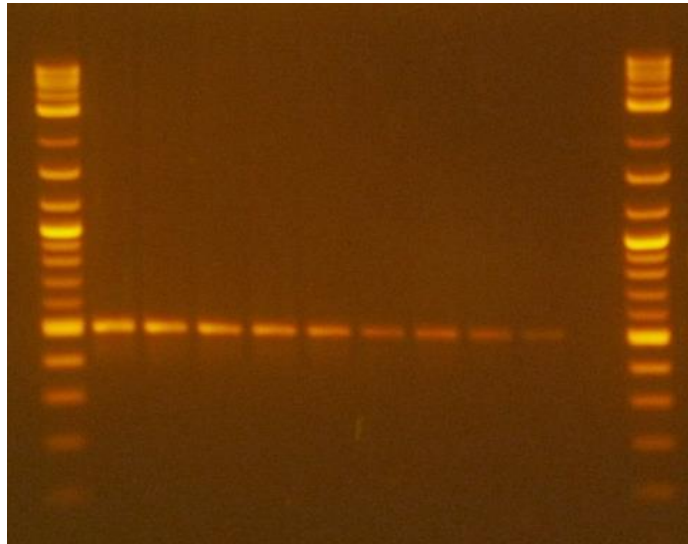
- Planární {
Papír
Gel

- Kapilární {
Gel
Zonální

- Na čipu {
Gel
Zonální

Vizualizace DNA: Gelová elektroforéza

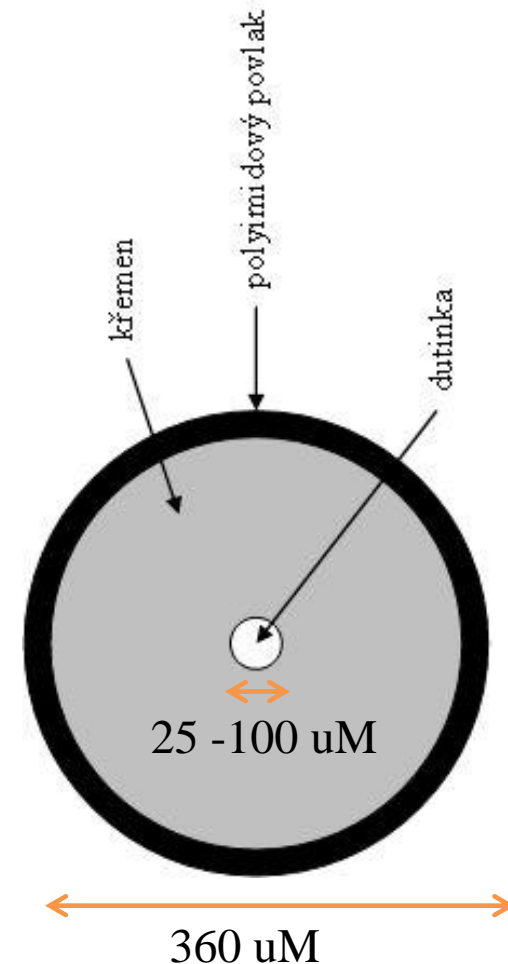
- Gely tvoří přechod mezi pevným a kapalným stavem. Strukturálně je gel z více než 90 % voda. V gelu nalézáme trojrozměrnou síť, kde póry mohou sloužit jako molekulové síto. Velikost pórů odpovídá velikosti proteinů a nukleových kyselin. Nejčastější gely jsou polyakrylamidový a agarózový.
- Pro vizualizaci proužků DNA se nejčastěji používá ethidium bromid



Vizualizace DNA: Kapilární gelová elektroforéza

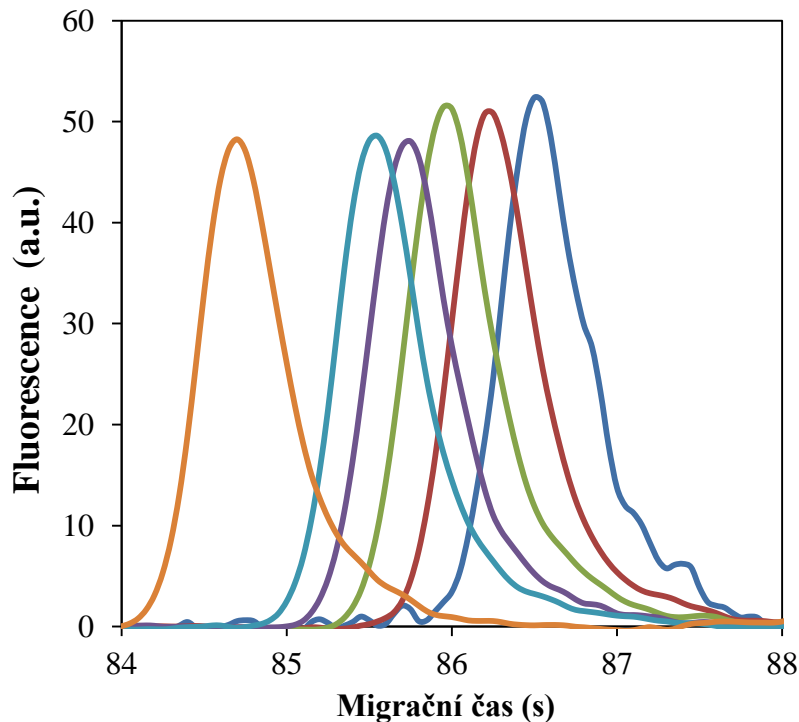
- kapilára je naplněna gelem - zvyšuje rozdíly mezi elektroforetickými rychlostmi velkých iontů různých tvarů, které jsou nuceny migrovat póry gelu
- dělí molekuly s nábojem (ionty) na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí
- používá se pro velké ionty jako peptidy, bílkoviny, sacharidy, DNA a RNA

Kapilára



Vizualizace DNA: čipová gelová elektroforéza

- Kapilární elektroforéza na čipu umožňuje simultánní analýzu až několika desítek vzorků během několika minut.



Vizualizace DNA: Elektrochemie

Objev polarografie



Jaroslav Heyrovský (1890 - 1967)

- Koncem roku 1921 napadlo Heyrovského měřit proud, který prochází kapkovou elektrodou
- První závislosti (polarografické křivky) zaznamenal při elektrolýze roztoku chloridu sodného
- V roce 1924 spolu se svým japonským spolupracovníkem sestavil přístroj pro automatický záznam křivek závislosti intenzity proudu v napětí, přístroj nazvali polarograf

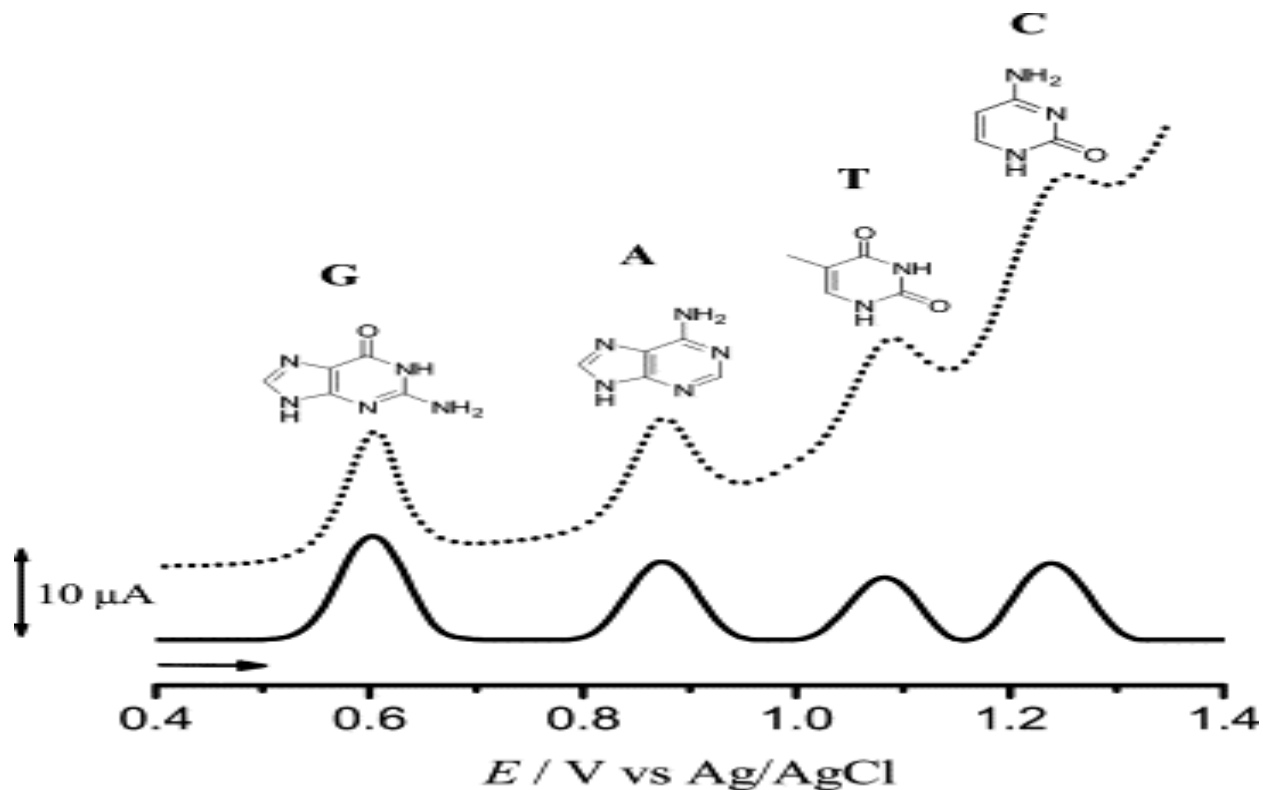
Vizualizace DNA: Elektrochemie

- Elektrochemie DNA se začala vyvíjet v polovině 50. let 20.století. Na jejím počátku stál **Emil Paleček**, který objevil a potvrdil elektrochemické vlastnosti nukleových kyselin (NK) pomocí oscilografické polarografie



Vizualizace DNA: Elektrochemie

- NK jsou elektrochemicky aktivní a jejich vlastnosti lze polarograficky, voltametricky nebo chronopotenciometricky analyzovat prostřednictvím měření proudových nebo jiných signálů vznikajících po jejich interakci s elektricky nabitými povrchy



Poděkování

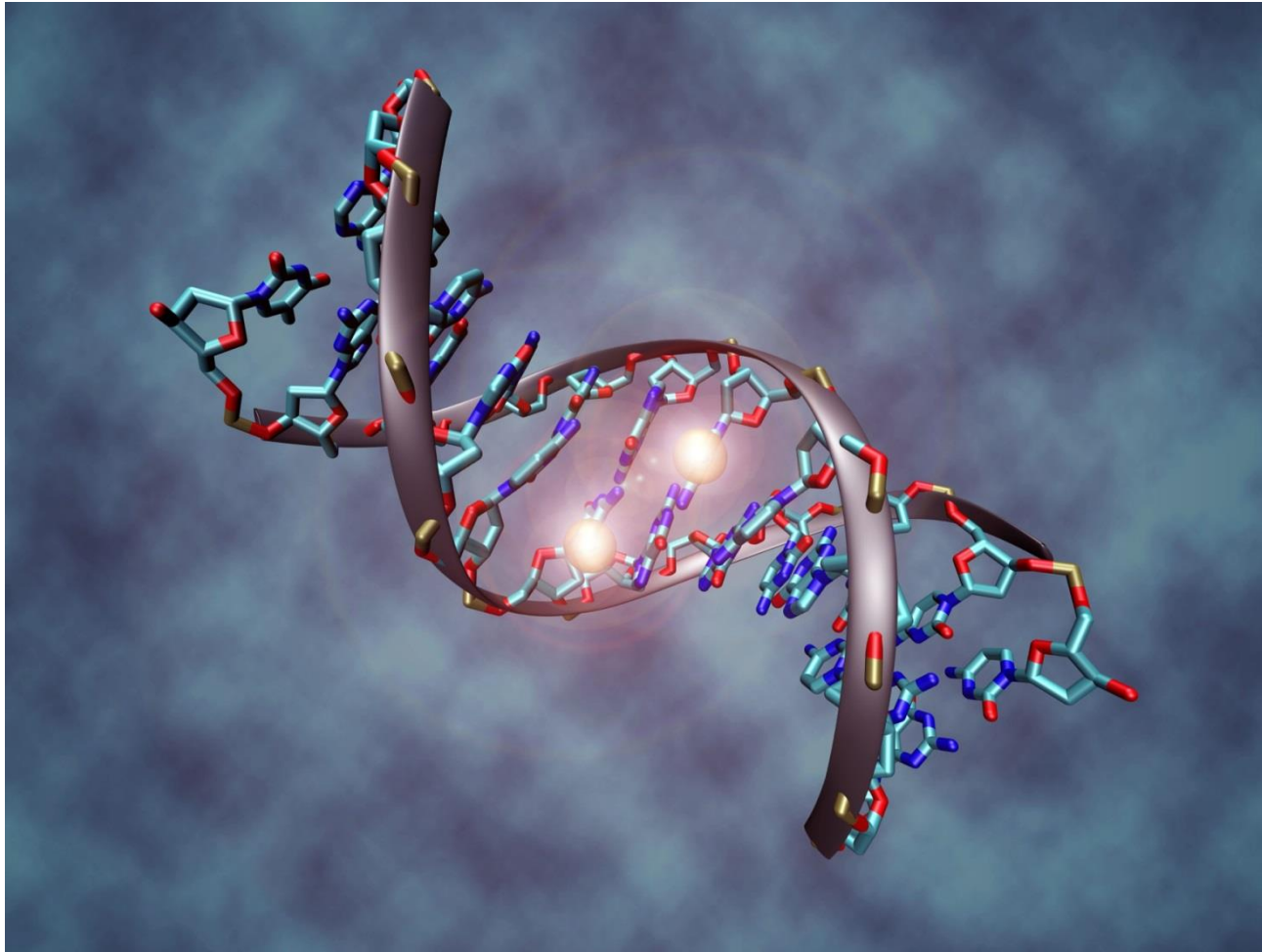
Projekt STRATO-NANOBIOLAB je podporován Fondem Mikroregionů CZ/FM.17A.666



FOND MIKROPROJEKTŮ



DĚKUJI ZA POZORNOST



PROGRAM
CEZHRANIČNEJ
SPOLUPRÁČE
SLOVENSKÁ REPUBLIKA
ČESKÁ REPUBLIKA



EURÓPSKA ÚNIA
EURÓPSKY FOND
REGIONÁLNEHO ROZVOJA
SPOLOČNE BEZ HRANÍČ



Mendelova
univerzita
v Brně



FOND MIKROPROJEKTŮ