UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Bc. Daria Arustamian

JEDNODUCHÝ ELEKTROCHEMICKÝ DNA BIOSENZOR PRO DETEKCI POŠKOZENÍ DNA ZPŮSOBENÉHO UV ZÁŘENÍM

Simple Electrochemical DNA Biosensor for Detection of DNA Damage Caused by UV Radiation

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2018

Tato diplomová práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt GAUK 430214/2014/B-CH/PřF) a Grantovou agenturou České republiky (projekt GAČR P206/12/G151).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. května 2018 _____

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, pomoc a cenné připomínky k mé diplomové práci.

Mé poděkovaní patří také rodičům a přátelům za všestrannou podporu.

Abstrakt

Ultrafialové (UV) záření je běžným činidlem poškozujícím DNA. Hlavní léze DNA, jako jsou cyklobutanové pyrimidinové dimery (CPD) a pyrimidin-(6-4)-pyrimidonové ((6-4)PP) fotoprodukty, jsou karcinogenní a mutagenní. Poškození DNA způsobené UV zářením bylo sledované pomocí jednoduchého elektrochemického DNA biosenzoru na bázi elektrody z ultračistého grafitu (UTGE) a nízkomolekulární dvouvláknové DNA (dsDNA) z lososích spermií. Biosenzor byl připraven adsorpcí dsDNA na povrch UTGE a následně použit pro detekci poškození dsDNA způsobeného UV zářením. Zkoumaní vlivu UV záření na dsDNA bylo provedeno pomocí kombinace několika elektrochemických technik: square-wave voltametrie pro přímé sledování oxidace DNA bází a cyklické voltametrie (CV) a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS), jako nepřímých elektrochemických metod, s použitím redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$. Optimalizace přípravy dsDNA/UTGE biosenzoru probíhala metodami CV a EIS, které umožňují charakterizovat povrch elektrody. Připravený dsDNA/UTGE biosenzor byl vystaven UV záření, jež bylo generováno pomocí UV lampy se dvěma nestanovitelnými vlnovými délkami: UVC při 254 nm a UVA při 365 nm. UVC záření bylo použito pro poškození DNA. Pokles signálu o 50 % byl zaznamenán po 20 minutách expozice UVC záření. UVA záření bylo použito pro porovnání vlivu různých druhů UV záření. Získané výsledky potvrdily, že UV záření způsobuje strukturní změny, poškození a degradaci DNA.

Abstract

Ultraviolet (UV) radiation is a common DNA damaging agent. Major DNA lesions, such as cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine-(6-4)-pyrimidone (6-4PPs) photoproducts, are carcinogenic and mutagenic. UV induced DNA damage was investigated using a simple electrochemical DNA biosensor based on an ultra-trace graphite electrode (UTGE) and low molecular weight doble-stranded DNA (dsDNA) from salmon sperm. Biosensor was prepared using adsorption of dsDNA on a surface of the UTGE and then used to detect UV-induced DNA damage. Effects of UV radiation were investigated using a combination of several electrochemical technics: square-wave voltammetry (SWV) for direct monitoring of DNA base oxidation and cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS), as non-direct methods, using redox-active indicator $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$. CV and EIS, which allow characterization of electrode surface, were used to optimize preparation of the dsDNA/UTGE biosensor. Prepared dsDNA/UTGE biosensor was exposed to UV radiation using UV lamp with two set wavelengths: UVC of 254 nm and UVA of 365 nm. UVC radiation was used to damage DNA. Relative signal decrease was 50% after 20 minutes of exposure to UVC radiation. UVA radiation was used to compare effects of different types of UV radiation. Obtained results confirm that UV radiation causes structural changes, damage and degradation of DNA.

Klíčová slova

Elektrochemický DNA biosenzor

Cyklická voltametrie

Square-wave voltametrie

Elektrochemická impedanční spektroskopie

Detekce poškození DNA

UV záření

Key Words

Electrochemical DNA biosensor

Cyclic Voltammetry

Square-Wave Voltammetry

Electrochemical Impedance Spectroscopy

DNA Damage Detection

UV Radiation

Seznam použitých zkratek

5-HmUra	5-hydroxymethyluracil
5-FoUra	5-formyluracil
5-OHCyt	5-hydroxycytosin
5-OHUra	5-hydroxyuracil
(6-4)PP	pyrimidin-(6-4)-pyrimidonové dimery
8-oxoG	8-oxo-7,8-dihydro-2‘-deoxyguanin
BCC	bazální buněčný karcinom
c	koncentrace
C	cytosin
CPD	cyklobutanové pyrimidinové dimery
CV	cyklická voltametrie
DSB	dvouvláknové zlomy
dsDNA	dvouvláknová DNA
E	elektrický potenciál
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
Fary-Ade	4,6-diamino-5-formamidopyrimidin
I	elektrický proud
$I_{p,a}$	elektrický proud píku, výška anodického píku
$I_{p,k}$	elektrický proud píku, výška katodického píku
Imid-Cyt	1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidin
MED	minimální erytemální dávka
NER	nukleotidová excizní reparace
PBS	fosfátový pufr
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových iontů
R_{CT}	odpor přenosu náboje
ROS	reaktivní formy kyslíku
S_0	signál změřený před expozicí biosenzoru UV záření
S_1	signál změřený po expozici biosenzoru UV záření
S	signál změřený na elektrodě bez dsDNA
S_{rel}	relativní odezva biosenzoru
SSB	jednovláknové zlomy
SED	standardní erytemální dávka

SCC	karcinom dlaždicových buněk
SWV	square-wave voltametrie
Thy-Gly	5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydrothymin
t	čas
t_{exp}	doba expozice
t_{ak}	doba akumulace
T	thymin
UTGE	elektroda z ultračistého grafitu
UV	ultrafialové
Z'	reální složka impedance
Z''	imaginární složka impedance

Obsah

1 Úvod……10

1.1 Cíl práce……10

1.2 UV záření……10

1.2.1 Účinky UV záření……10

1.2.2 Přímá absorpce UV záření……12

1.2.3 Vliv reaktivních forem kyslíku……13

1.2.4 Další produkty poškození DNA UV zářením……14

2 Experimentální část……15

2.1 Použité chemikálie……15

2.2 Přístroje a zařízení……15

2.3 Pracovní postupy……17

2.3.1 Elektrochemická měření……18

2.3.2 Práce s DNA biosenzorem……18

3 Výsledky a diskuze……18

3.1 Optimalizace přípravy dsDNA/UTGE biosenzoru……18

3.2 Detekce poškození dsDNA UV zářením……23

3.2.1 Square-wave voltametrie (SW) ……23

3.2.2 Cyklická voltametrie (CV) a elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)……26

3.2.3 Porovnaní vlivu UVA a UVC záření……31

4 Závěr……32

5 Literatura……33

1 Úvod

1.1 Cíl práce

Cílem diplomového projektu je zkoumání využití elektrody z ultračistého grafitu (UTGE) pro přípravu jednoduchého elektrochemického biosenzoru pro detekci poškození dvouvláknové DNA (dsDNA) způsobeného UV zářením.

Byla optimalizována příprava dsDNA/UTGE biosenzoru. Optimalizace byla provedena pomocí cyklické voltametrie (CV), s použitím redoxního indikátoru v podobě ekvimolární směsi ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}) $K_3[Fe(CN)_6]$ a $K_4[Fe(CN)_6]$, a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) s využitím stejného indikátoru. Při optimalizaci byly sledovány vlivy různých koncentrací dsDNA a různých časů akumulace při adsorpci dsDNA na povrch elektrody.

Vytvořený biosenzor byl použit při detekci poškození DNA způsobeného UV zářením a při porovnaní účinku UVA a UVC záření na dsDNA. Jako detekční techniky byly použité square-wave voltametrie (SWV), CV a EIS.

1.2 UV záření

1.2.1 Účinky UV záření

Každý je po celou dobu svého života vystaven UV záření ze slunce a z mnoha umělých zdrojů. Ultrafialové (UV) záření má kratší vlnové délky než viditelné světlo, ale delší než rentgenové záření. Slunce emituje celé spektrum UV záření, které lze rozdělit na tři kategorie UVA (315 – 400 nm), UVB (280 – 315 nm) a UVC (100 – 280 nm). Intenzita UVB záření je nepřímo úměrná zeměpisné šířce a přímo úměrná nadmořské výšce, změna množství UVA záření s geografickou polohou je minimální. Atmosféra (včetně ozonové vrstvy) absorbuje celé UVC záření a téměř 95 % UVB záření, takže většina UV záření dopadajícího na povrch Země se skládá většinou z UVA záření a malého množství UVB záření.[1–7]

UVC záření nedopadá na povrch Země, ale vytváří se pro různé aplikace komerčně vyráběnými UVC lampami. Nízkotlaké rtuťové lampy se používají při malých a středních průtocích vody při desinfekčních anebo oxidačních procesech v úpravnách vod; takové aplikace zahrnují široké spektrum typů vod (pitné vody, podzemní vody, průmyslové a odpadní vody, ultračistá voda či voda ve veřejných bazénech). Lampy z měkkých skel se většinou používají pro dezinfekci pitné vody a pro ošetřování domácích vodních systémů (akvária, rybníky, soukromé bazény atd.), v transiluminátorech a sterilizačních zařízeních. Čištění vzduchu, které zahrnuje dezinfekční a oxidační procesy vyvolané UV zářením, je žádoucí v systémech klimatizací, sterilních místnostech nemocnic, laboratořích a zalidněných veřejných místech. Oxidace vzduchu se používá pro odstranění zápachu (čističky odpadních vod, veřejné toalety, hotely, restaurace, provozy zpracovávající potraviny atd.). Germicidní UVC záření se používá pro zneškodnění bakterií na obalových materiálech v potravinářském průmyslu.[8]

Běžně polední hodnoty UV indexu v České republice se v létě pohybují kolem 7, což se považuje již za vysokou hodnotu. Tato hodnota odpovídá po přepočítání na denní dávku UV záření poškozujícího DNA přibližně hodnotě 0,2 J cm^{-2} a po přepočítání na erytemální denní dávku UV záření poškozujícího DNA přibližně hodnotě 0,4 J m^{-2}.[9,10] Přepočet UV indexu na erytemální denní dávku UV záření je odvozen z akčního spektra pro citlivost kavkazské kůže k úžehu pod vlivem UV záření. Standardní erytemální dávka (standard erythemal dose – SED) a minimální erytemální dávka (minimal erythemal dose – MED) byly přijaty a standardizovány Mezinárodní komisí pro osvětlování. MED se používá pro pozorovací studie u lidí a zvířat. SED je standardizovaná hodnota: 1 SED je ekvivalentní 100 J m^{-2} erytemálně účinného záření.[10]

Malé množství UV záření je užitečné pro člověka a esenciální pro produkci vitaminu D. UV záření je možné použít při léčbě některých nemocí, jako jsou křivice, lupus vulgaris, psoriáza, vitiligo. Ale dlouhodobá expozice UV záření má negativní akutní a chronické zdravotní účinky na kůži, oči a imunitní systém. Úžeh a opalování jsou nejvíce známé akutní účinky nadměrné expozice UV záření. Chronické účinky zahrnují stárnutí kůže a rakovinu. Zčervenění pokožky po vystavení UV záření je způsobeno především UVB zářením.[2,12] Mezi nejproblematičtější onemocnění, která souvisejí s nadměrnou expozicí slunečnímu světlu, se řadí rakovina kůže a šedý zákal (kataraktum).[7]

Rakovina kůže je nejběžnější typ rakoviny u člověka. Dva hlavní typy nemelanomální rakoviny kůže jsou bazální buněčný karcinom (BCC) a karcinom dlaždicových buněk (SCC). 80 % případů nemelanomální rakoviny kůže připadá na BCC. Epidemiologické studie rakoviny kůže uvádějí, že se toto onemocnění objevuje častěji u lidí pracujících venku než u těch pracujících v krytých místnostech. Melanom je nádor pigmentové buňky (melanocytu) kůže. Na rozdíl od nemelanomálních rakovin kůže, které se lečí chirurgicky, mají melanomy tendence metastázovat.[13–15] Mezi 2 až 3 miliony případů nemelanomální rakoviny kůže na světě je ročně přibližně 132 tisíc melanomálních rakovin kůže.

Jiným vážným problémem, který souvisí s účinky nadměrné expozice UV záření, je šedý zákal. Podle odhadů Světové zdravotnické organizace je až 20 % případů slepoty vyvoláno nebo zhoršeno expozicí slunečnímu záření, zejména pak v Indii, Pákistánu a v jiných státech blízko rovníku.[7]

Dalším druhem rakoviny, který vyvolává UV záření, je perorální rakovina. Ročně je celosvětově diagnostikováno přibližně 40 tisíc případů perorální rakoviny. Buňky ústní dutiny mají vyšší riziko vyvinutí rakoviny než tkáně kůže při stejné dávce. Schopnost tkáně ústní dutiny opravovat cyklobutanové pyrimidinové dimery (CPD) je značně nižší než tato schopnost buněk pokožky. Buňky kůže odstraňují cca 42 % CPD po 24 hodinách, buňky dásní cca 50 % a buňky dutiny ústní cca 17 %. Ale snížení schopnosti opravovat CPD nemusí být důvodem zvýšení karcinogenního rizika, protože takové buňky jsou většinou odstraněny apoptózou. Příčinou zvýšení karcinogenního rizika je pravděpodobně neschopnost buněk dásní a buněk ústní dutiny odstraňovat pyrimidin-(6-4)-pyrimidonové dimery [(6-4)PP].[16,17]

Schopnost UVA vyvolat SCC je pěttisíckrát až desettisíckrát nižší než u UVB.[13] UVB je většinou absorbováno buňkami horní vrstvy pokožky, zatímco UVA prochází hlouběji do kožních keratinocytů,

fibroblastů a melanocytů. Poškození DNA během buněčného dělení v bazální vrstvě pokožky se může zakonzervovat jako somatická mutace a stát se příčinou vzniku rakoviny kůže.[18–21] Avšak většina lézí způsobených UV zářením se jako mutace nekonzervují, protože buňka je chráněna celou řadou antimutagenních mechanismů, včetně nukleotidové excizní reparace (nucleotide excision repair – NER), zastavení buněčného cyklu a apoptózy.[22] Všechny typy UV záření vyvolávají tvorbu CPD, ale UVC a UVB jsou téměř tisíckrát až stotisíckrát účinnější při vzniku CPD než UVA. Takovýto rozdíl je dan nízkou absorpcí UVA záření molekulou DNA.[4,6] UV záření působí na DNA jednak prostřednictvím jeho přímé absorpce, jednak nepřímým mechanismem, který zahrnuje absorpce záření fotosensitizérem nebo tvorbu reaktivních kyslíkových forem.[23–26]

1.2.2 Přímá absorpce UV záření

Hlavními fotoprodukty přímé absorpce UV záření jsou CPD a (6-4)PP. CPD je považován za hlavní kancerogenní faktor způsobený UV zářením, protože (6-4)PP je účinně opravován pomocí NER.[27–30] Na rozdíl od opravy (6-4)PP, oprava CPD potlačuje vznik kožních karcinomů tvorbou dvouvláknových zlomů.[27]

Molární absorpční koeficient DNA je nižší než součet odpovídajících koeficientů jednotlivých bází, protože míra absorpce závisí na interchromoforových interakcích v důsledku elektronového párování. Nejpravděpodobnějším mechanismem účinku UV záření na molekulu DNA je přenos náboje. Tento děj iniciuje vznik nestabilních intermediátů (volných radikálů) a stabilních fotoproduktů.[31–33] Dimerizace pyrimidinových bází je převládající reakce v důsledku přímé absorpce UV záření. CPD jsou vytvořeny přes excitovaný tripletový stav a (6-4)PP se tvoří Paterneho-Büchiho reakcí. Vznik CPD nastává, když přilehlé pyrimidinové báze absorbují energii UV záření, tvoří se cyklobutanový kruh kovalentní vazbou mezi C5 a C6 uhlíkovými atomy obou bází. V (6-4)PP vzniká necyklická kovalentní vazba mezi C6 a C4 atomy sousedních pyrimidinů. Fotoprodukty (6-4)PP podstupují prostřednictvím UV záření další konverze se svým fotoizomerem – Dewarovým pyrimidinem. Kromě běžných fotoproduktů se mohou tvořit vzácné dimery, např. heterodimer adenin-thymin nebo 2-imidazolon-(5-4)-pyrimidone, což je jiný fotoizomerizační produkt (6-4)PP.[19,31]

Cytosin v CPD je nestabilní a jednoduše deaminuje – výsledkem je uracilová báze. Takže CPD mají tendenci z cytosinovým zbytkem deaminovat na uracilové CPD. CPD, (6-4)PP a Dewarův izomer blokují syntézu DNA tím, že braní pohybu DNA polymerázy během replikace DNA. Buňky se snaží zbavit se těchto fotoproduktů mechanismem opravy DNA, který se jmenuje NER. Chyba opravování vede k zastavení replikace, k tvorbě zlomů v DNA a ke smrti buňky.[34–36]

Thymin v DNA se při působení UV záření o vlnové délce 270 nm přeměňuje na svůj fotodimer. Fotodimerizace nastává v thymidinových sekvencích, kde jsou thyminové báze situovány vedle sebe.[31]

1.3.3 Vliv reaktivních forem kyslíku

Oxidační stress probíhá jako pozdní událost (až několik hodin po ozáření), což naznačuje, že UV záření aktivuje metabolické dráhy, které mohou být zodpovědné za tvorbu zlomů ve struktuře DNA, oxidaci bází DNA a jiná poškození.[19]

UV záření generuje reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species – ROS), jako jsou hydroxylové radikály ($HO^{\bullet}$), superoxidový anion radikál ($O_2^{\bullet-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a singletový kyslík ($^1O_2$). ROS jsou mediátory poškození DNA a hrají důležitou roli jako mediátory oxidačního stresu v biologických systémech.[37,38] Reakce ROS s pyrimidinovými a purinovými bázemi vyvolávají tvorbu cca 80 identifikovaných intermediátů.[39]

Vysoce reaktivní hydroxylové radikály účinně reagují se všemi čtyřmi nukleovými bázemi a 2-deoxyribosovými zbytky. Hydroxylový radikál preferenčně reaguje s C5 a C6 atomy. Dva hlavní mechanismy reakce hydroxylových radikálu s thyminem objevené v jaderné DNA jsou: navázání se k 5,6-pyrimidinové vazbě a abstrakce atomu vodíku z methylové skupiny. Navázáním k 5,6-pyrimidinové vazbě vzniká *cis*- a *trans*-diastereomer 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydrothymin (Thy-Gly) – jeden s hlavních produktů degradace thyminu. Abstrakce atomu vodíku z methylové skupiny vede ke vzniku derivátů 5-hydroxymethyluracilu (5-HmUra) a 5-formyluracilu (5-FoUra). Bylo detekováno několik stabilních produktů cytosinu: 5-hydroxycytosin (5-OHCyt), 5-hydroxyuracil (5-OHUra), 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrouracyl (Ura-Gly), 5-hydroxyhydantoin (Hyd-Ura) a 1-karbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidin (Imid-Cyt). Oxidace guaninu a adeninu probíhá podobným způsobem: reakce hydroxylového radikálů s C8 báze za vzniku 8-oxo-7,8-dihydro-2‘-deoxyguaninu (8-oxoG) a 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidinu (Fapy-Gua) a 8-oxo-7,8-dihydro-2‘-deoxyadeninu (8-oxoA) a 4,6-diamino-5-formamidopyrimidinu (Fary-Ade).[37] Koncentrace oxidovaných derivátů adeninu je vždycky asi o řad nižší než odpovídajících derivátů guaninu, protože guanine je báze DNA s nejnižším oxidačním potenciálem. Toto může vést k přenosu elektronu z guaninu, což způsobuje vznik tandemových klastrových poškození DNA. 8-oxoG je nejenom markerem oxidačního stresu, ale i také chrání DNA od dalšího poškození tím, že je ještě snadněji oxidovatelný než guanin.[40–43] Analýza buněk poškozených UV zářením ukázala, že oxidační poškození DNA má pravděpodobně malý vliv na celkovou toxicitu a mutagenitu, protože je generováno v množství o 2 až 3 řady nižším než CPD nebo (6-4)PP a snadno se opravuje. 50% 8-oxoG je odstraněno buněčnými opravnými mechanismy během 6 hodin, žádná významná oprava CPD za stejný čas pozorována nebyla.[44–46]

Hydroxylové radikály způsobují převážně vznik zlomů vlákem DNA, a to mechanismem zahrnujícím abstrakce atomů vodíku z atomů C3, C4 a C5. Kompetitivní reakce se sacharidy vedou k tvorbě tandemových lézí a aduktů 2-deoxyribosy.[39]

Peroxid vodíku je produktem dismutace superoxidového anion radikálu a téměř nereaguje s DNA bázemi a 2-deoxyribosou, pokud není přítomný iont přechodného kovu (např. železo podporuje vznik

hydroxylových radikálů; měď podporuje vznik singletového kyslíku).[39,41,47] Singletový kyslík selektivně oxiduje guaninové báze (vzniká 8-oxoGua) a může dál oxidovat meziprodukty radikálové oxidace.[41,42]

Oxidační stress může následně způsobit nežádoucí účinky, jako je peroxidace lipidů a proteinů.[18] Reakcí, ve kterých je oxidační stres způsobený UV zářením, se účastní malé biomolekuly (např. riboflavin, tryptofan, porfyrin, chinony), které se chovají jako endogenní fotosenzitizéry a vznikají ROS.[1,19,34] Endogenní fotosenzitizéry mohou účinkovat prostřednictvím jednoelektronové (nebo jednoprotonové) reakce (mechanismus typu I) anebo přes tripletový přenos energie s tvorbou singletového kyslíku (mechanismus typu II).[40]

Riboflavin se účastní degradace guaninu mechanismem typu II.[48] Melanin má dvojí roli fotoprotektoru a fotosenzitizéru: při přímé vazbě na DNA je přímým fotosenzitizérem (podporuje tvorbu ROS), ale ochraňuje také kůži před spálením, poškozením DNA, mitochondriální produkcí superoxidu jako fotoprotektor, a to díky svému neobvykle širokému absorpčnímu spektru.[18,49] Poškození DNA způsobené UV zářením klesá v roztocích obsahujících tryptofan, protože tryptofan je sloučenina, která preferenčně absorbuje UV záření.[28]

Většina produktů oxidace 2-deoxyribosy jsou produkty reakce s hydroxylovým radikálem.[41] V 2-deoxyribose DNA je možná oxidace každé z pěti pozic mechanismem abstrakce atomu vodíku za vzniku radikálu centralizovaného na uklíku, který může vázat další kyslík pro vznik dalšího peroxylového radikálu.[50]

1.3.4 Další produkty poškození DNA UV zářením

Dalšími typy poškození DNA UV zářením jsou meziřetězcové můstky (DNA-protein kroslinky), jedno- a dvouvláknové zlomy (single- (SSB) / double-strand breaks (DSB)).[3]

Meziřetězcové můstky vznikají, když se proteiny kovalentně váží na chromosomální DNA. Vazba může být iniciovaná reakcí bočních řetězců bílkoviny s elektrofilními lézemi DNA. Reakce ROS s guaninovými, cytosinovými nebo thyminovými bázemi DNA a lysinovými nebo tyrosinovými postranními řetězci bílkovin tvoří volné radikály nebo elektrofilní léze, které mohou následně reagovat s jinými makromolekulami tak, že způsobují vznik kovalentního meziřetězcového můstku. Např. oxidovaná abazická místa vznikající působením ROS (2-deoxyribosalakton) mohou tvořit amidové konjugáty s takovými proteiny, jako jsou *Escherichia coli* endonuklása III a DNA polymeráza β.[51]

UV záření vyvolává SSB a DSB. Hromadění SSB v těsné blízkosti (cca 1 spirálový obrat molekuly DNA) se nazývá klastrová nebo komplexní léze. Klastrové léze mohou vznikat při oxidačních procesech nebo při ionizačním ozáření. Pokud nejsou klastrové léze opraveny během fáze G1 buněčného růstu, jsou opravným mechanismem vystřihnuty, a takovým způsobem vzniká DSB. Během buněčné fáze S mohou DSB způsobit chromozomální aberace.[52–58]

UV záření vyvolává charakteristickou záměnu cytosinu (C) za thymin (T) a tandemovou záměnu CC za TT. Tyto dvě mutace jsou považovány za typické cíle pro dimerizaci způsobenou UV zářením.[20,27,34] Tyto

typické mutace byly detekované v genu p53 lidí trpících SCC.[20,27] Přechodové mutace genu p53 se vyskytují v 90 % SCC a v 50 % BCC.[20]

Protein p53 je znám jako látka protirakovinná či látka potlačující vznik nádorů, a to díky jeho schopnosti kontrolovat normální růst a geonomickou stabilitu zastavením fáze G1 buněčného cyklu indukcí apoptózy v odpovědi na buněčný stres. p53 se aktivuje fosforylací na jednom nebo několika serinových zbytcích. V jádře se váže na zesilovač/promotér cílového genu, a tím reguluje jeho transkripci. p53 je faktor transkripce DNA s krátkou dobou života. Normálně je přítomné velmi malé množství p53, ale v odpovědi na poškození se protein akumuluje, buněčné dělení se zastavuje a začíná se oprava DNA. SSB a DSB spolu s pyrimidinovými dimery způsobenými UV zářením vyvolávají fosforylaci p53 na několika serinových zbytcích. Nadměrná indukce p53 může vyvolat apoptózu.[20,59–61]

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie a roztoky

K přípravě všech vodných roztoků byla použita deionizovaná voda produkovaná systémem Millipore Q-plus systém (Millipore, USA). Další použité chemikálie byly:

• fosfátový pufr (PBS) o koncentraci 0,1 mol l^{-1} (pH 7,0) byl připraven rozpouštěním 23,9 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného (čistota p.a., Lachema, ČR) a 6,6 g monohydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného (čistota p.a., Lachema, ČR) v deionizované vodě. Celkový objem připraveného roztoku byl 1,0 l.

• roztok dsDNA v PBS, koncentrace 10 mg ml^{-1}, připraven rozpuštěním 100 mg z nízkomolekulární dsDNA z lososích spermií (dsDNA; Product No. 31149, Sigma–Aldrich, USA) v 10 ml fosfátového pufru o pH 7,0. Roztoky o nižších koncentracích byly připravené rozpouštěním zásobního roztoku dsDNA v PBS. Nízkomolekulární dsDNA z lososích spermií byla skladována v lednici při teplotě 4 °C.

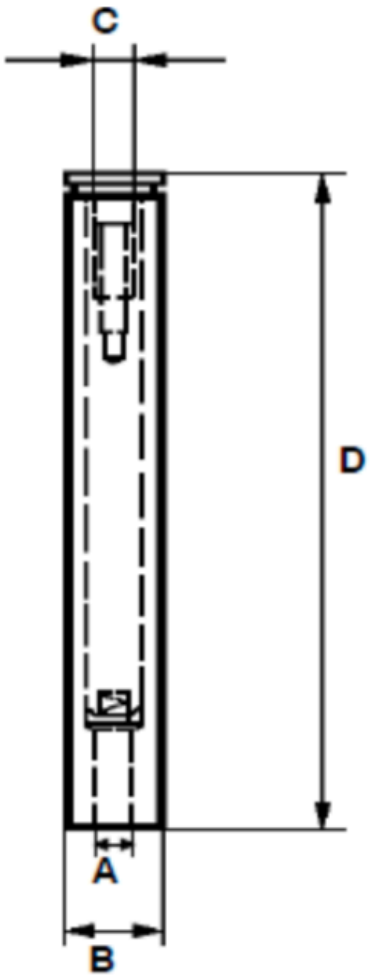
• ekvimolární směs hexakyanoželezitanu draselného (čistota p.a., Lachema, ČR) a hyxakyanoželeznatanu draselného (čistota p.a., Lachema, ČR) o koncentrace $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1} byla připravena v 500-ml odměrné baňce rozpouštěním 0,1651 g $K_4[Fe(CN)_6]$ a 0,2101 g $K_3[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ve fosfátovém pufru o pH 7,0.

2.2 Přístroje a zařízení

Cyklická voltametrie (CV), elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) a square-wave voltametrie (SWV) byly měřeny na přístroji MicroAutolab III/FRA 2 (Eco Chemie, Nizozemsko). Pro měření CV a SWV byl použit software GPES (General Purpose Electrochemical System), verze 4.9, a pro měření EIS byl použit software FRA (Frequency Response Analysis), verze 4.9. MicroAutolab III/FRA 2 byl řízen stolním počítačem s operačním systémem Microsoft Windows XP Professional. Výsledky byly zpracovány programem Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA) a grafy byly vytvořeny v programu Origin Pro verze 8.0 (OriginLab, USA).

Měření probíhala ve tříelektrodovém zapojení sestávajícím se z argentchloridové referentní elektrody (typ RAE 113, 3 mol l^{-1} KCl, Monokrystaly, ČR), platinové pomocné elektrody (typ PPE, Monokrystaly, ČR) a pracovní elektrody z ultračistého grafitu (Ultra-Trace-Graphit-Electrode – UTGE) s průměrem disku 2 mm (Metrohm, Švýcarsko) (obr. 2-1). UTGE nemá přesně definovaný mikrostrukturní profil. Elektroda se skládá z porézní grafitové struktury vyplněné epoxidovou pryskyřicí. Elektroda o průměru disku 2 mm je zapouzdřena v těle z polyetheretherketonu (PEEK) pomocí epoxidové pryskyřice. Elektrochemický aktivní uhlíkové částice jsou na povrchu i uvnitř elektrody nepravidelně distribuované. UTGE vykazuje chování podobné mikroelektrodám.[62]

Obr. 2-1 Elektroda z ultračistého drafitu (UTGE).



Obr. 2-2 Elektroda z ultračistého grafitu (UTGE), schéma poskytuje výrobce. A – průměr disku 2 mm (±0,1 mm), B – průměr disku celé elektrody 7 mm, C – kontakt o velikosti M3, D – délka elektrody 52,5 mm.

Expozice UV záření byla provedena pomocí UV lampy s dvěma nastavitelnými vlnovými délkami záření UVC (254 nm) a UVA (365 nm) (model IV, výkon 2×15 W, P-LAB, ČR).

2.3 Pracovní postupy

Všechny experimenty se skládaly z čtyř následujících kroků: mechanického čištění povrchu UTGE; elektrochemické adsorpce dsDNA na povrchu UTGE; expozice připraveného dsDNA/UTGE biosenzoru UV záření; detekce a vyhodnocení poškození dsDNA indukovaného UV zářením. Elektrochemická detekce poškození dsDNA byla prováděna pomocí přímé elektrochemické metody založené na oxidaci bází dsDNA (square-wave voltametrie (SWV)) a nepřímých elektrochemických metodách (cyklická voltametrie (CV) a elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)) s použitím redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$. DNA byla na povrch UTGE adsorbována pomocí elektrochemické akumulace s použitím vybraného akumulačního potenciálu a času akumulace. Každý záznam byl proveden s nově připraveným dsDNA/UTGE biosenzorem.

2.3.1 Elektrochemická měření

Cyklická voltametrie (CV) byla měřena v 10 ml ekvimolární směsi (c = $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}) $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ v PBS při rychlosti polarizace byla 0,05 V s^{-1}, s potenciálovým krokem 0,003 V a v potenciálovém rozsahu od 0 V do 0,5 V.

Výšky píků (elektrický proud píku, výška anodického píku ($I_{p,a}$) a výška katodického píku ($I_{p,k}$)) $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ byly vyhodnoceny z extrapolované lineární časti voltamogramu před začátkem píku.

Relativní odezva biosenzoru byla vypočtená podle vzorce ΔS_{rel} (%) = $[(S_1 - S)/(S_0 - S)] \times 100$, kde S_0 a S_1 jsou signály změřené před a po expozici biosenzoru UV záření a S je signál změřený na elektrodě bez dsDNA.

Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) byla měřena v 10 ml ekvimolární směsi (c = $1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}) $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ v PBS při polarizačním potenciálu 0,225 V. Rozsah použitých frekvencí byl 0,1 až 5000 Hz (měřeno 51 bodů), potenciálová amplituda byla 0,01 V. Při měření EIS byl sledován odpor přenosu náboje (R_{CT}). Tato hodnota byla získána z Nyquistových grafů jejich fitováním pomocí funkce Fit v softwaru FRA. Náhradní fitovací obvod měl složení R1(Q1[R2W1].

Square-wave voltametrie (SWV) byla měřena v 10 ml PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) s následujícími parametry: potenciálový rozsah od 0 V do 1,8 V, frekvence 200 Hz, potenciálový krok 0,015 V, amplituda potenciálu 0,05 V. Byly vyhodnocovány píky guaninu a adeninu a jejich výšky byly přepočteny na relativní odezvu biosenzoru podle vzorce S_{rel} (%) = $(S_1/S_0) \times 100$, kde S_0 a S_1 jsou signály změřené před a po expozici biosenzoru UV záření.

2.3.2 Práce s biosenzorem

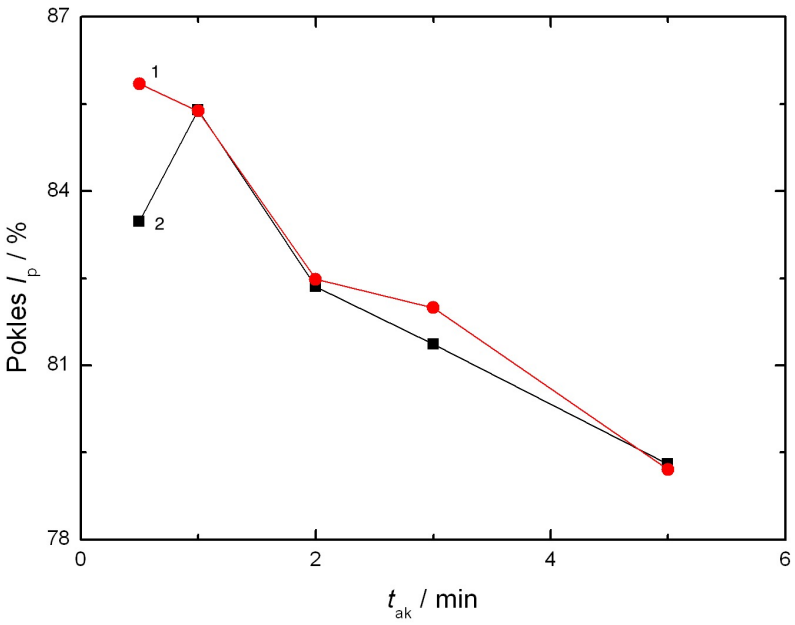
Akumulace dsDNA byla prováděna z 10 ml roztoku nízkomolekulární dsDNA (c = 10 mg ml^{-1}), na elektrodu byl po dobu 1 min vkládán potenciál 0,5 V.

Čištění elektrody probíhalo mechanicky, otřením elektrody o sametovou podložku potřenou suspenzí oxidu hlinitého (velikost částic 0,5 μm) ve vodě.

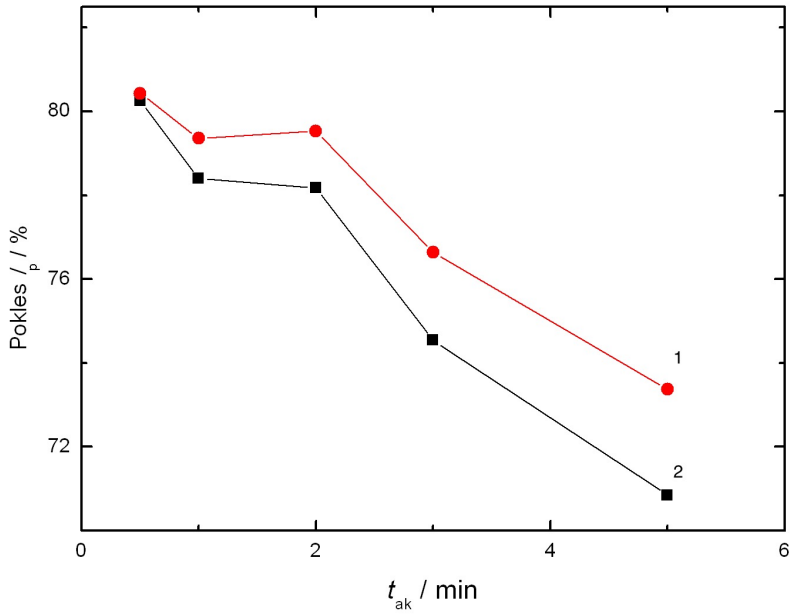
3 Výsledky a diskuze

3.1 Optimalizace přípravy dsDNA/UTGE biosenzoru

Elektrochemický DNA biosenzor na bázi UTGE (dsDNA/UTGE biosenzor) byl připraven adsorpcí dsDNA na povrchu UTGE. Povrch UTGE byl čištěn mechanicky (oleštěním pomocí suspenze oxidu hlinitého; velikost částic 0,5 μm) a opláchnut deionizovanou vodou. Optimální parametry adsorpce dsDNA byly hledány pro koncentraci dsDNA a čas adsorpce. Adsorpční potenciál (E_{ads} = 0,5 V) byl převzat z publikace.[63]



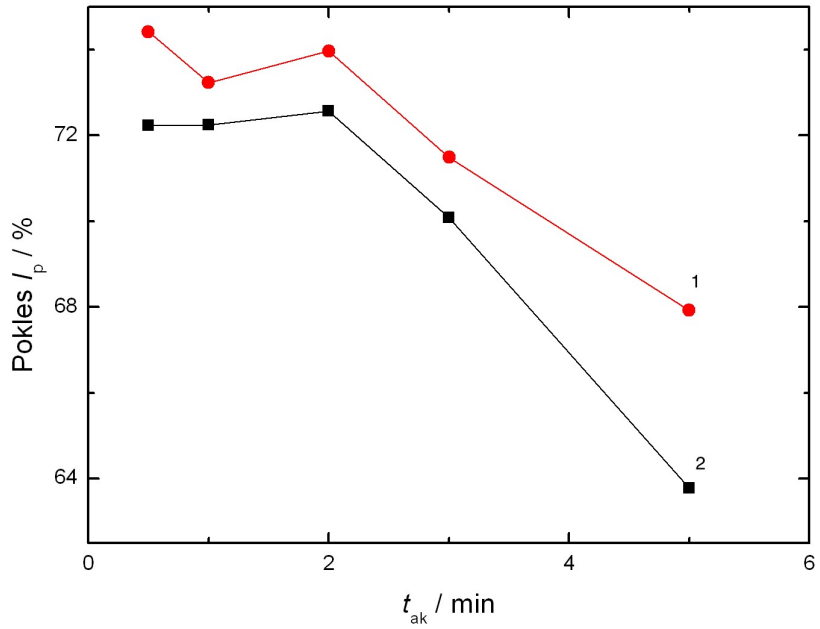
Obr. 3-1. Závislost poklesu I_p redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ (c = 1·10^{-3} mol l^{-1}) (hodnota 100 % odpovídá odezvě získané ne nemodifikované UTGE) na době akumulace dsDNA (t_{ak}) o koncentraci 0,1 mg ml^{-1}; měřeno na dsDNA/UTGE technikou CV v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0); akumulace dsDNA byla provedena při potenciálu 0,5 V. 1 – $I_{p,a}$, 2 – $I_{p,k}$.



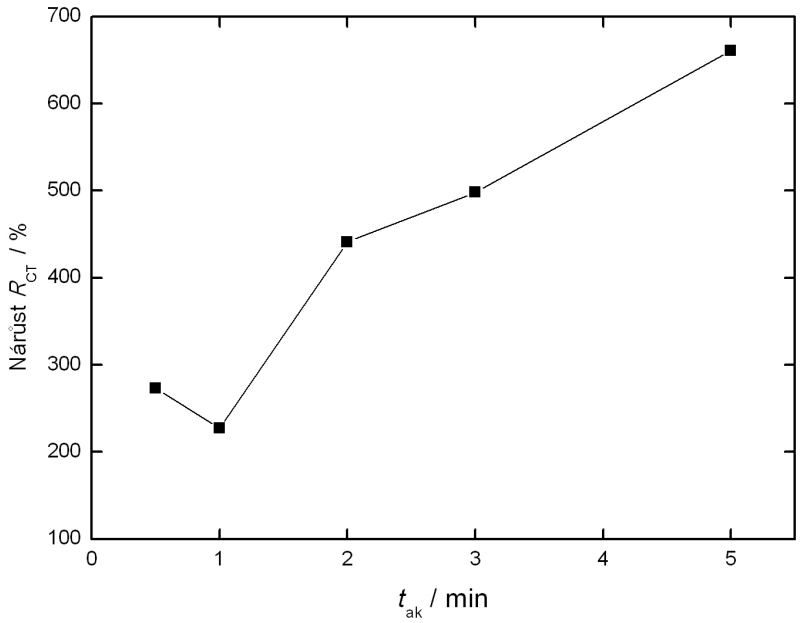
Obr. 3-2. Závislost poklesu I_p redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ (c = 1·10^{-3} mol l^{-1}) (hodnota 100 % odpovídá odezvě získané ne nemodifikované UTGE) na době akumulace dsDNA (t_{ak}) o koncentraci 1 mg ml^{-1}; měřeno na dsDNA/UTGE technikou CV v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0); akumulace dsDNA byla provedena při potenciálu 0,5 V. 1 – $I_{p,a}$, 2 – $I_{p,k}$.

Akumulace dsDNA probíhala při koncentracích 0,1 mg ml^{-1}, 1 mg ml^{-1} a 10 mg ml^{-1} po dobu 30 s, 1 min, 2 min, 3 min a 5 min. Měření bylo provedeno metodami CV a EIS. Po akumulace byl připravený biosenzor inkubován v PBS 5 s před měřením. Naměřené změny výšek CV píků $I_{p,a}$ a $I_{p.k}$ redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ jsou zobrazeny na obr. 3-1 pro koncentraci dsDNA v akumulačním roztoku 0,1 mg ml^{-1}, na obr. 3-2 pro koncentraci 1 mg ml^{-1} a na obr. 3-3 pro koncentraci 10 mg ml^{-1}. Zaznamenané změny R_{CT} při EIS jsou zobrazeny na obr. 3-4 pro koncentraci 0,1 mg ml^{-1}, na obr. 3-5 pro koncentraci 1 mg ml^{-1} a na obr. 3-6 pro koncentraci 10 mg ml^{-1}.

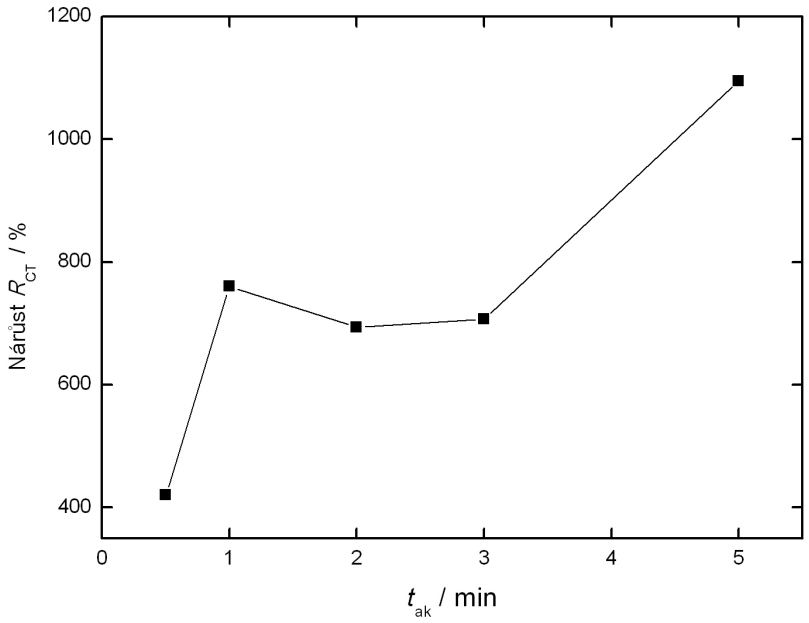
Adsorpce DNA ovlivňuje přenos náboje a odporové vlastnosti elektrody. Záporně nabitý redoxní indikátor $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ ukazuje přítomnost vrstvy DNA na elektrodovém povrchu prostřednictvím elektrostatického odporu vůči záporně nabitým řetězcům DNA – čím větší množství DNA je na povrchu navázáno, tím je repulzní odpor větší. Tato změna se projevuje poklesem signálu redoxního indikátoru na cyklickém voltamogramu. Při koncentraci dsDNA 10 mg ml^{-1} a době akumulace 1 min (obr. 3-7) byl zaznamenán pokles signálu získaného na dsDNA/UTGE biosenzoru v porovnání se signálem získaným na nemodifikované UTGE o 2,48 μA. Delší doba akumulace (5 min) vedla k poklesu píku až o 3 μA, takový nárůst změna signálu však nevyváží prodloužení celé procedury přípravy biosenzoru, proto byly optimální podmínky pro přípravu biosenzoru zvoleny následovně: c_{DNA} = 10 mg ml^{-1} a t_{ak} = 1 min).



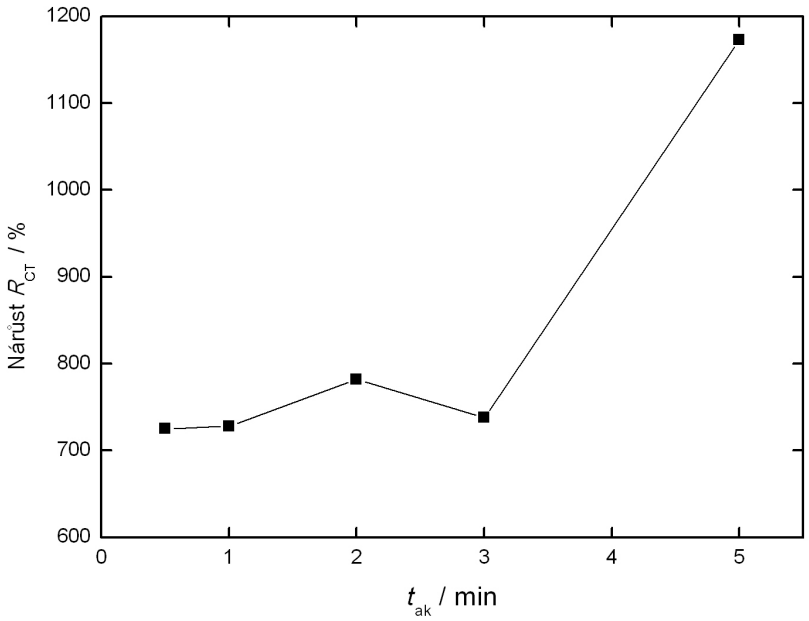
Obr. 3-3. Závislost poklesu I_p redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ (c = 1·10^{-3} mol l^{-1}) (hodnota 100 % odpovídá odezvě získané ne nemodifikované UTGE) na době akumulace dsDNA (t_{ak}) o koncentraci 10 mg ml^{-1}; měřeno na dsDNA/UTGE technikou CV v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0); akumulace dsDNA byla prováděna při potenciálu 0,5 V. 1 – $I_{p,a}$, 2 – $I_{p,k}$.



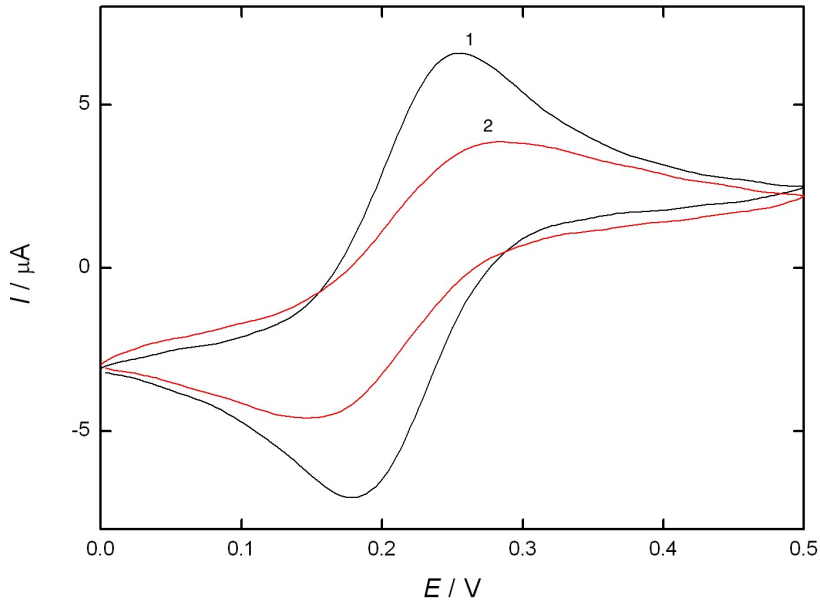
Obr. 3-4. Závislost nárůstu R_{CT} (hodnota 100 % odpovídá odezvě získané ne nemodifikované UTGE) na době akumulace dsDNA (t_{ak}) o koncentraci 0,1 mg ml^{-1}; měřeno na dsDNA/UTGE technikou EIS v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) pomocí redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ (c = 1·10^{-3} mol l^{-1}); akumulace dsDNA byla prováděna při potenciálu 0,5 V.



Obr. 3-5. Závislost nárůstu R_{CT} (hodnota 100 % odpovídá odezvě získané ne nemodifikované UTGE) na době akumulace dsDNA (t_{ak}) o koncentraci 1 mg ml^{-1}; měřeno na dsDNA/UTGE technikou EIS v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) pomocí redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ (c = 1·10^{-3} mol l^{-1}); akumulace dsDNA byla prováděna při potenciálu 0,5 V.

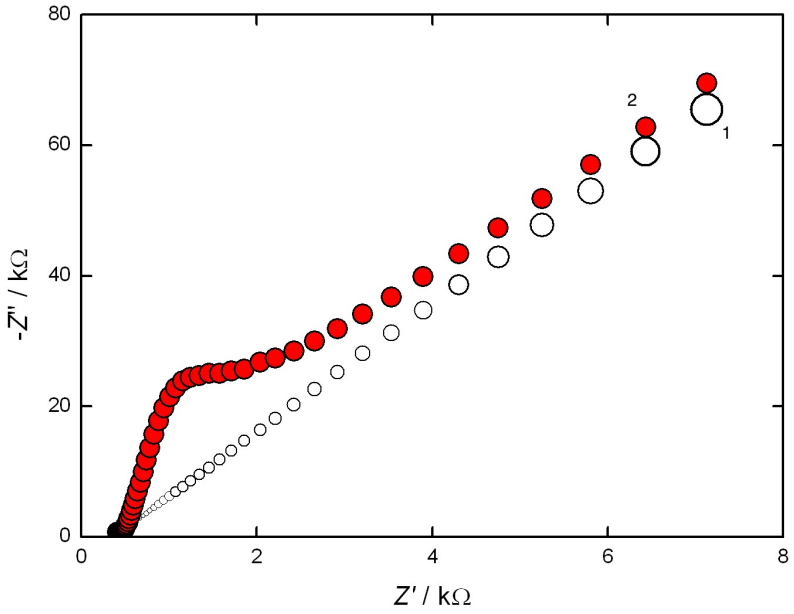


Obr. 3-6. Závislost nárůstu R_{CT} (hodnota 100 % odpovídá odezvě získané ne nemodifikované UTGE) na době akumulace dsDNA (t_{ak}) o koncentraci 10 mg ml^{-1}; měřeno na dsDNA/UTGE technikou EIS v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0), pomocí redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ (c = 1·10^{-3} mol l^{-1}); akumulace dsDNA byla prováděna při potenciálu 0,5 V.



Obr. 3-7. Cyklické voltamogramy zaznamenané na UTGE (1) a na dsDNA/UTGE (2) (c_{DNA} = 10 mg ml^{-1}, t_{ak} = 1 min) v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) pomocí redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ (c = 1·10^{-3} mol l^{-1}).

Na Nyquistově grafu je adsorpce dsDNA charakterizovaná zvýšením průměru půlkruhu, ze kterého se počítá odpor přenosu náboje (obr. 3-8). Hodnota R_{CT} za optimálních podmínek činila 3,7 kΩ.



Obr. 3-8. Nyquistovy grafy zaznamenané na UTGE (1) a na dsDNA-UTGE (2) (c_{DNA} = 10 mg ml^{-1}, t_{ak} = 1 min) v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) pomocí redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol l^{-1}).

3.3 Detekce poškození DNA UV zářením

3.3.1 Square-wave voltametrie (SWV)

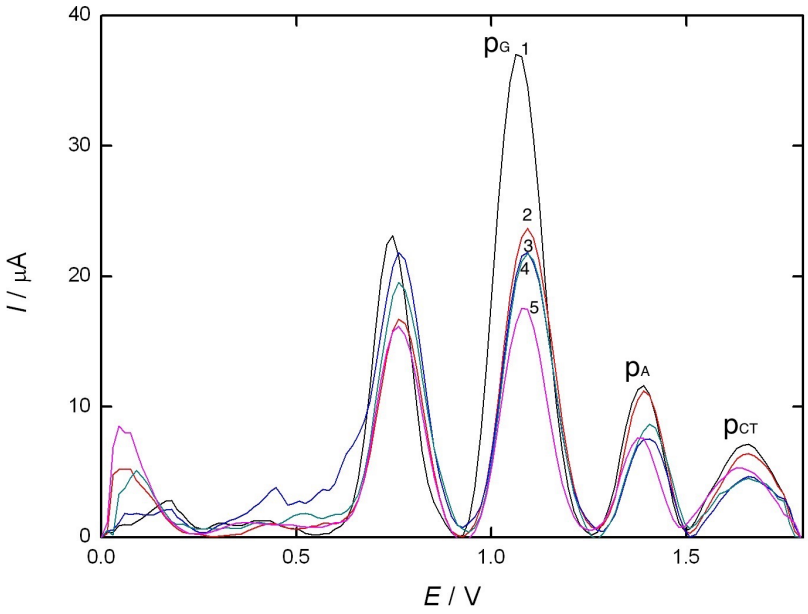
SWV je citlivá metoda dovolující použití relativně rychlých skenů (až jednotky V s^{-1}) pro detekci poškození dsDNA. Při detekci poškození DNA byly změřené signály dsDNA před a po expozici UVC záření. Byly pozorované tři oxidační píky bází vázaných v DNA (obr. 3-9): p_G – pík guanosinu, p_A – pík adenosinu a p_{TC} – pík thymidinu a cytidinu. Tyto anodické voltametrické píky byly pozorované při potenciálech p_G – 1,0 V (p_G), 1,3 V (p_A) a 1,6 V (p_{CT}). Jen pík guanosinu byl použit v dalším studiu pomocí připraveného dsDNA/UTGE biosenzoru. Pík před píkem guanosinu blízko 0,8 V je pravděpodobně píkem volného guanosinu (guanosinmonofosfátu) nezačleněného do struktury dsDNA[64,65], který je přítomný v roztoku v důsledku slabých degradačních změn vyvolaných dlouhým skladováním chemikálie. Ke změnám složení DNA dochází i při skladovaní DNA v ledničce při teplotě 4 °C.

Připravený dsDNA/UTGE biosenzor byl vystaven UVC záření po dobu expozice (t_{exp}) 2, 5, 10 a 20 min. SW voltamogramy byly zaznamenané ve fosfátovém pufru (pH=7,0). Výška píku guanosinu se snižovala se zvýšením doby expozice. Záznamy dsDNA/UTGE (korigované na základní linii) před a po expozici UVC záření jsou uvedeny na obr. 3-9 pro vzdálenost biosenzoru od zdroje záření 1 cm, na obr. 3-10 pro vzdálenost

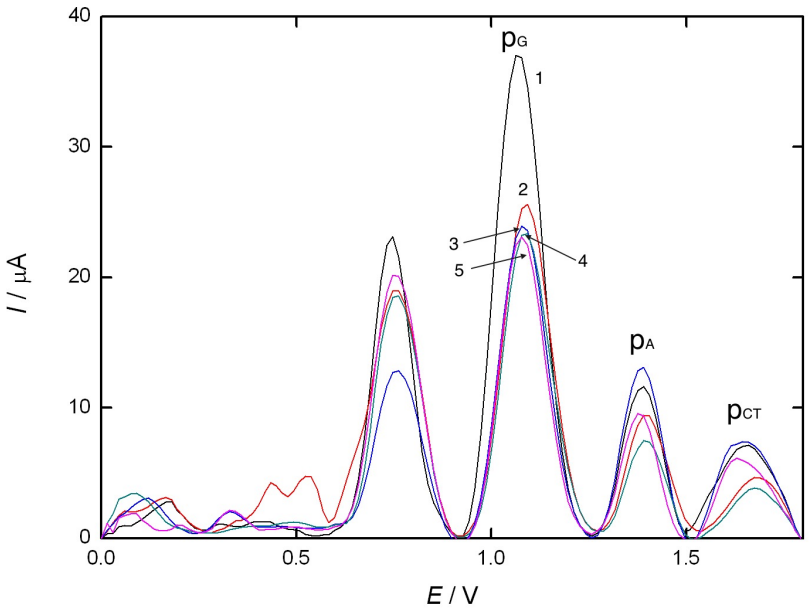
2 cm a na obr. 3-11. pro vzdálenost 3 cm. Relativní odezvy biosenzoru vyhodnocené z guanosinových píků jsou zobrazené na obr. 3-12.

Píky guanosinu a adenosinu se snižovaly se zvyšujícím se časem expozice UVC záření. Větší oxidace byla pozorovaná při menší vzdálenosti od zdroje záření. Rychlý a strmý pokles relativní odezvy dsDNA/UTGE biosenzoru byl pozorován při vzdálenosti 1 cm. Během 2 min klesnul pík guanosinu na 36 % jeho původní výšky. Při větších vzdálenostech byl pokles píku guanosinu po 2 min: 22 % při vzdálenosti 2 cm a 6 % při vzdálenosti 3 cm. Pík guanosinu se snižoval při zvýšení času expozice a při nejdelších časech klesal až na 50 % své původní výšky.

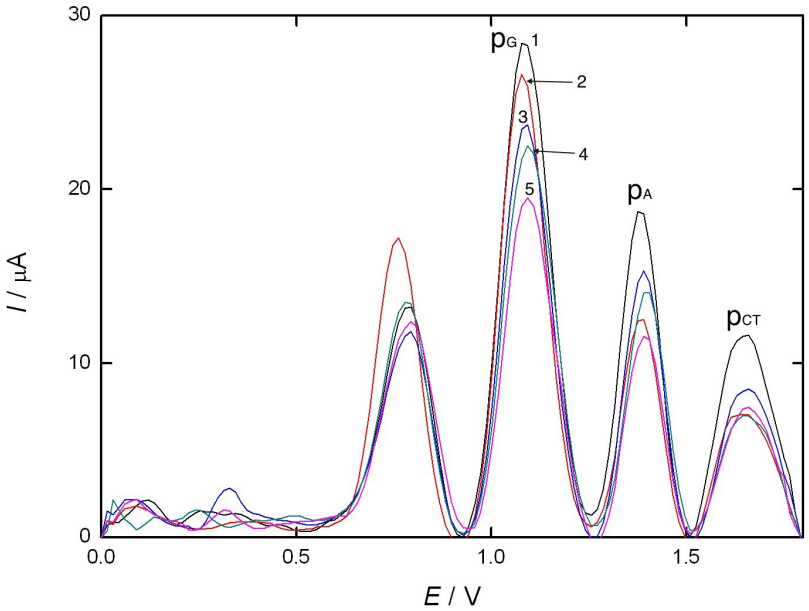
Metodou SWV pozorujeme jen celkovou oxidaci bází a nemůžeme určit, jaký byl detailní mechanismus poškození dsDNA.



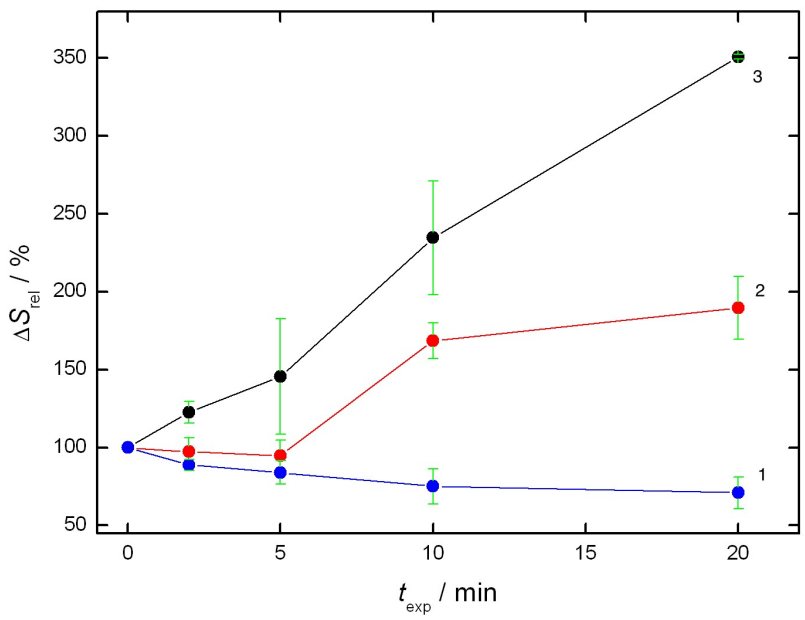
Obr. 3-9. SWV odezvy bází dsDNA na dsDNA/UTGE biosenzoru zaznamenané v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) před a po expozici UVC záření. Oxidační signály: p_G – pík guanosinu, p_A – pík adenosinu, p_{CT} – pík thymidinu a cytidinu. dsDNA/UTGE biosenzor byl vystaven UVC záření na dobu exposice t_{exp} (min): 0 (1), 2 (2), 5 (3), 10 (4) a 20 (5) při vzdálenosti 1 cm.



Obr. 3-10. SWV odezvy bází dsDNA na dsDNA/UTGE biosenzoru zaznamenané v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) před a po expozici UVC záření. Oxidační signály: p_G – pík guanosinu, p_A – pík adenosinu, p_{TC} – pík thymidinu a cytidinu. dsDNA/UTGE biosenzor byl vystaven UVC záření na dobu exposice t_{exp} (min): 0 (1), 2 (2), 5 (3), 10 (4) a 20 (5) při vzdálenosti 2 cm.



Obr. 3-11. SWV odezvy bází dsDNA na dsDNA/UTGE biosenzoru zaznamenané v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) před a po expozici UVC záření. Oxidační signály: p_G – pík guanosinu, p_A – pík adenosinu, p_{TC} – pík thymidinu a cytidinu. dsDNA/UTGE biosenzor byl vystaven UVC záření na dobu exposice t_{exp} (min): 0 (1), 2 (2), 5 (3), 10 (4) a 20 (5) při vzdálenosti 3 cm.



Obr. 3-12. Závislost relativních odezev biosenzoru vyhodnocené z píku guanosinových zbytků v dsDNA (p_G – 1,0 V) na době exposice (t_{exp}) biosenzoru UVC záření o vlnové délce 254 nm. Měření provedeno při třech různých vzdálenostech od zdroje záření: 1 cm (1), 2 cm (2) a 3 cm (3); n = 3.

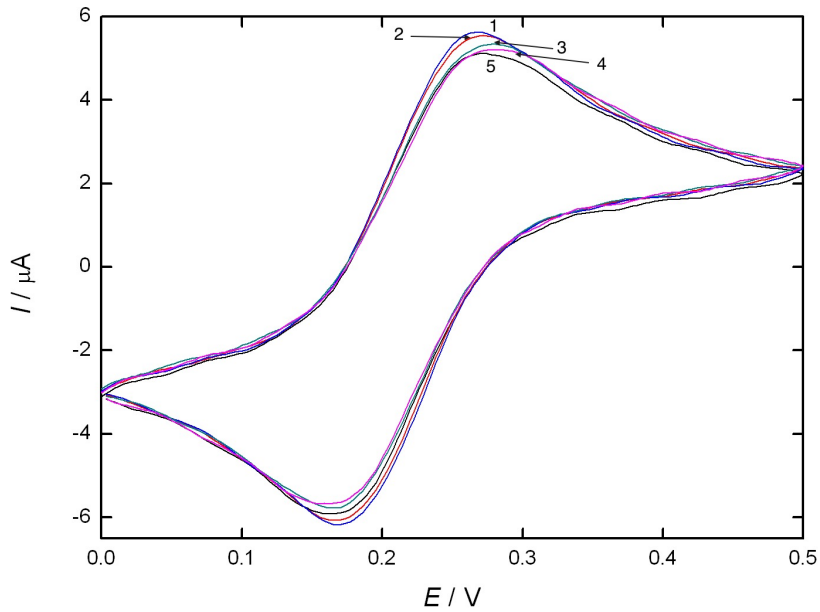
3.3.2 Cyklická voltametrie (CV) a elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)

Při výzkumu metodami CV a EIS se používá redoxní indikátor $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$, který nepřímo poukazuje na přítomnost vrstvy DNA na elektrodovém povrchu zvýšeným odporem přenosu svého náboje vlivem elektrostatické repulze záporně nabitého řetězce DNA. Indikátory se používají pro detekci přítomnosti a poškození DNA a pro jednoduchou elektrochemickou a elektrickou charakterizace elektrodového povrchu. Výšky anodického ($I_{p,a}$) a katodického ($I_{p,k}$) píku 1 mmol l^{-1} $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ byly změřeny CV a odpor přenosu náboje (R_{CT}) byl změřen EIS před a po expozici dsDNA/UTGE biosenzoru UVC záření.

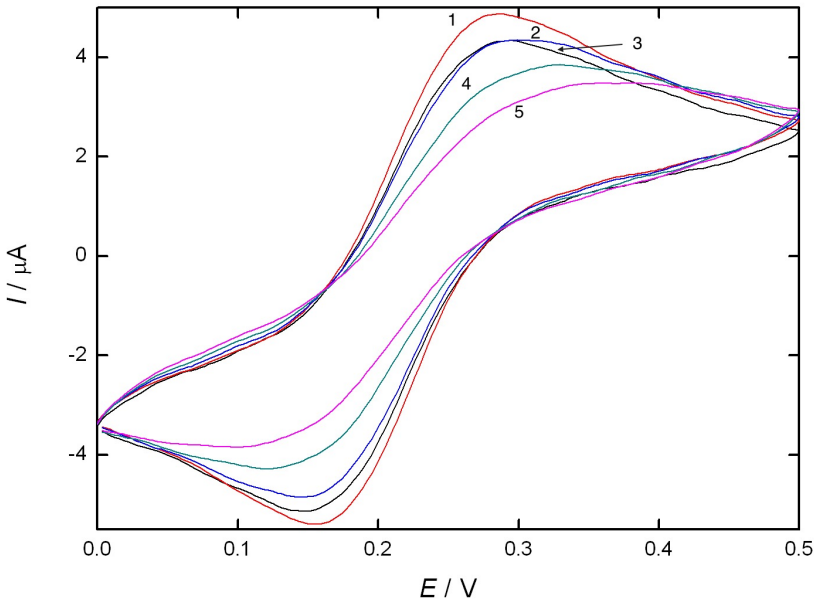
dsDNA/UTGE biosenzor byl vystaven expozici UVC záření po rozličnou dobu (2, 5, 10 a 20 min). Relativní odezva biosenzoru byla vypočtena z hodnot $I_{p,a}$, $I_{p,k}$ a R_{CT}.

Pro CV (obr. 3-13, 3-14 a 3-15) se relativní odezvy dsDNA/UTGE biosenzoru zvyšovaly se zvýšením doby expozice UVC záření při vzdáleností 3 cm od jeho zdroje. Po 20 minutách došlo ke zvýšení signálu na 189 % (obr. 3-15 a 3-16). Taková změna ukazuje na tvoření více kompaktní vrstvy DNA na povrchu elektrody. Taková vrstva muže vzniknout v důsledku rozpadu fosfodiesterových vazeb v dsDNA a tvorby CPD, (6-4)PP a jiných oxidačních aduktů nukleových bází. Při vzdálenosti 2 cm pozorujeme po 20 minutách expozice UVC záření zvýšení signálu na 134 % (obr. 3-14 a 3-16). Při menší vzdálenosti od zdroje UVC záření (1 cm) došlo ke snížení relativní odezvy biosenzoru. Signál poklesl na 63 % (obr. 3-13 a 3-16). Snížení signálu ukazuje na

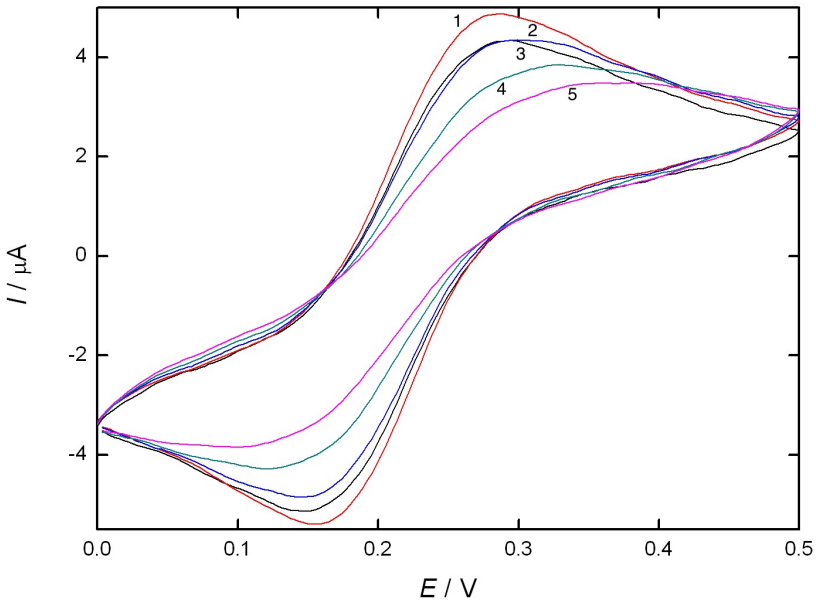
uvolnění dsDNA z povrchu elektrody v důsledku její degradace – pravděpodobně dochází při větším stupni poškození ke vzniku jednořetězcových zlomů.



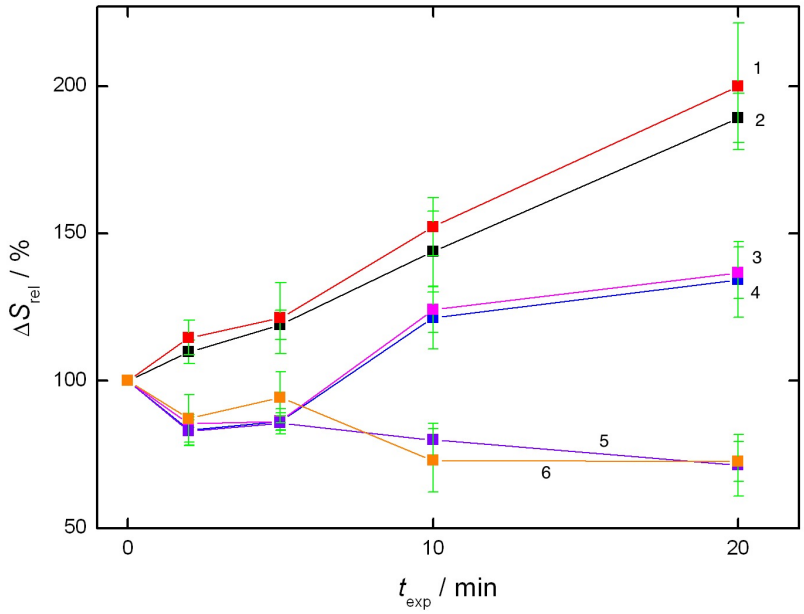
Obr. 3-13. Cyklické voltamogramy 1 mmol l^{-1} $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) zaznamenané na dsDNA/UTGE biosenzoru, který byl vystaven UVC záření po dobu expozice t_{exp} (min): 0 (1), 2 (2), 5 (3), 10 (4) a 20 (5) při vzdálenosti 1 cm od zdroje záření.



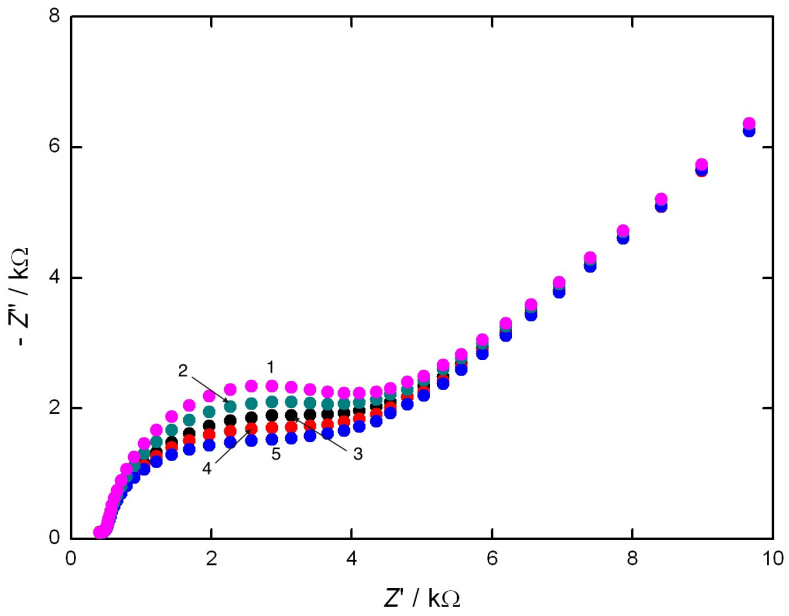
Obr. 3-14. Cyklické voltamogramy 1 mmol l^{-1} $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) zaznamenané na dsDNA/UTGE biosenzoru, který byl vystaven UVC záření po dobu expozice t_{exp} (min): 0 (1), 2 (2), 5 (3), 10 (4) a 20 (5) při vzdálenosti 2 cm od zdroje záření.



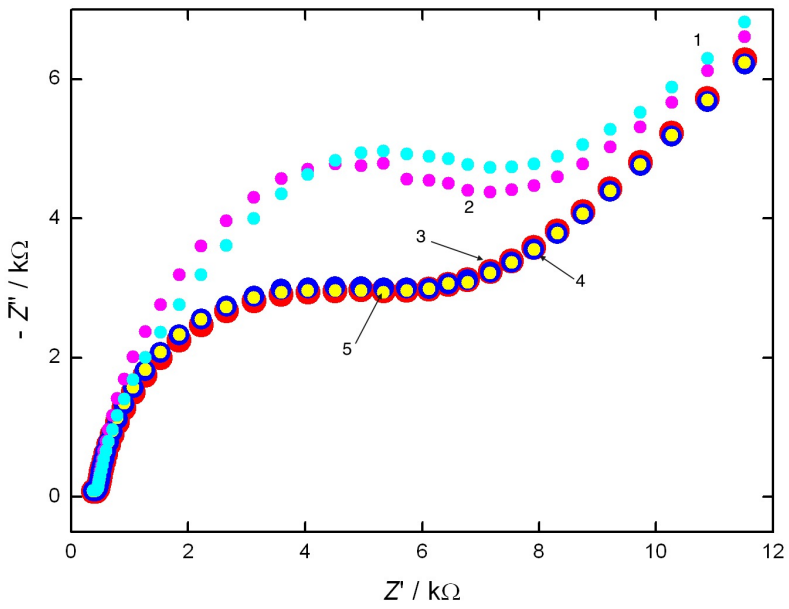
Obr. 3-15. Cyklické voltamogramy 1 mmol l^{-1} $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) zaznamenané na dsDNA/UTGE biosenzoru, který byl vystaven UVC záření po dobu expozice (t_{exp}) (min): 0 (1), 2 (2), 5 (3), 10 (4) a 20 (5) při vzdálenosti 3 cm od zdroje záření.



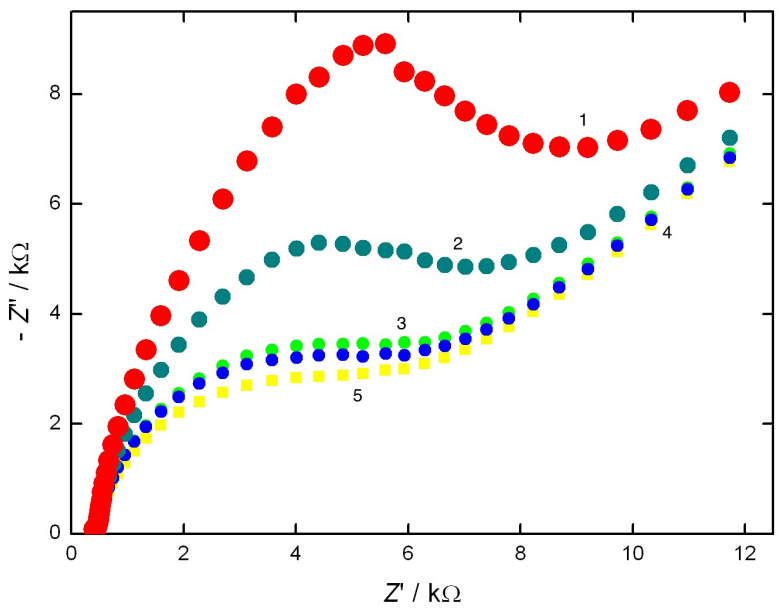
Obr. 3-16. Závislost relativní odezvy biosenzoru (ΔS_{rel}) vypočítané z výšek anodických a katodických píků redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ na době expozice biosenzoru UVC záření o vlnové délce 254 nm. Měření provedeno při tře různých vzdálenostech biosenzoru od zdroje záření: 3 cm – $I_{p,a}$ (1), $I_{p,k}$ (2), 2 cm – $I_{p,a}$ (3), $I_{p,k}$ (4), 1 cm – $I_{p,a}$ (5), $I_{p,k}$ (6); n = 3.



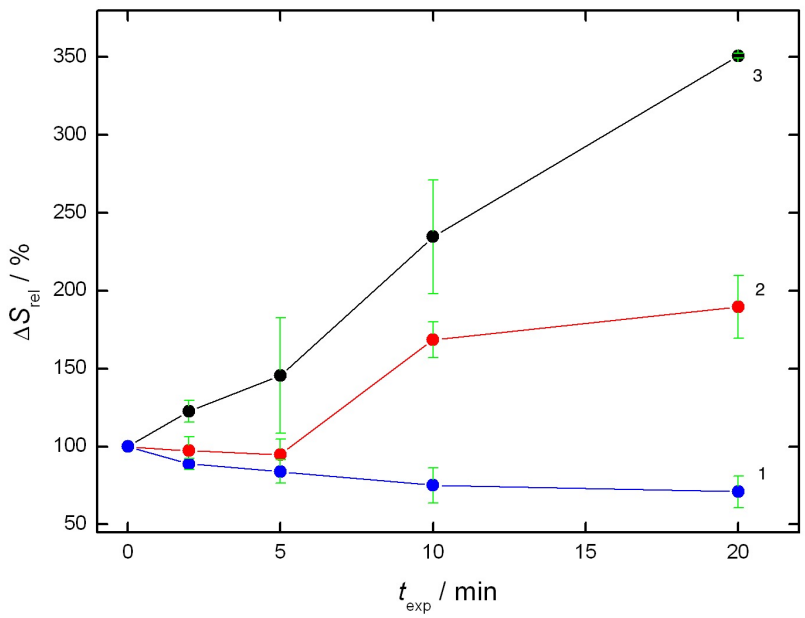
Obr. 3-17. Nyquistovy grafy zaznamenané v přítomnosti 1 mmol l^{-1} $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) na dsDNA/UTGE biosenzoru, který byl vystaven UVC záření po dobu expozice t_{exp} (min): 0 (1), 2 (2), 5 (3), 10 (4) a 20 (5) při vzdálenosti 1 cm od zdroje záření.



Obr. 3-18. Nyquistovy grafy zaznamenané v přítomnosti 1 mmol l^{-1} $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) na dsDNA/UTGE biosenzoru, který byl vystaven UVC záření po dobu expozice t_{exp} (min): 0 (1), 2 (2), 5 (3), 10 (4) a 20 (5) při vzdálenosti 2 cm od zdroje záření.



Obr. 3-19. Nyquistovy grafy zaznamenané v přítomnosti 1 mmol l^{-1} $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ v PBS (c = 0,1 mol l^{-1}, pH 7,0) na dsDNA/UTGE biosenzoru, který byl vystaven UVC záření po dobu expozice t_{exp} (min): 0 (1), 2 (2), 5 (3), 10 (4) a 20 (5) při vzdálenosti 3 cm od zdroje záření.



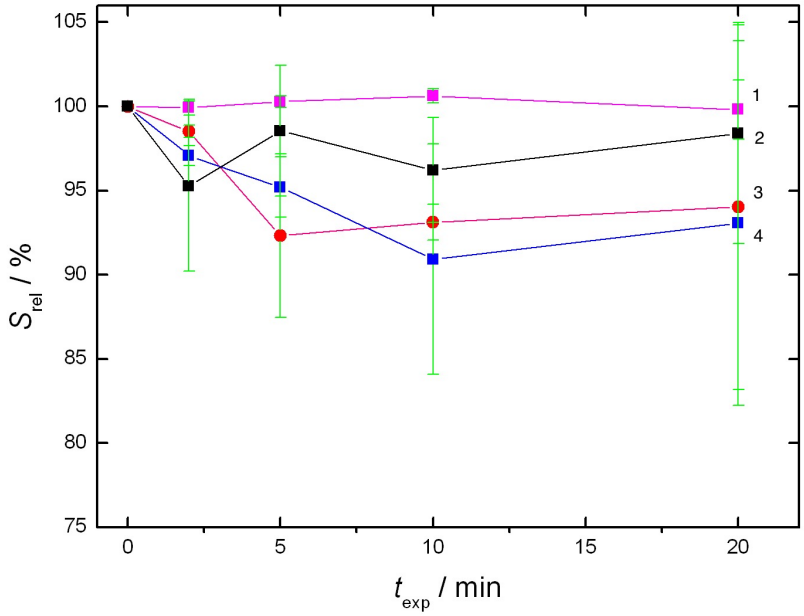
Obr. 3-20. Závislost relativní odezvy biosenzoru (ΔS_{rel}) vypočítané z hodnot R_{CT} $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ na době expozice (t_{exp}) dsDNA/UTGE biosenzoru UVC záření o vlnové délce 254 nm. Měření provedeno pro tři různé vzdálenosti od zdroje záření: 1 cm (1), 2 cm (2) a 3 cm (3); n = 3.

Výsledky získané pomocí EIS (obr. 3-17, 3-18 a 3-19) dobře korelují s těmi z CV. Relativní odezva biosenzoru vyhodnocená z hodnot odporu přenosu náboje vzrostla na 350 % při měření po 20 minutách ozáření při nejvyšší vzdálenosti 3 cm (obr. 3-19 a 3-20). Při vzdálenosti 2 cm se hodnota zvýšila na 190 % (obr. 3-18 a 3-20) a při nejmenší vzdálenosti (1 cm) snížila na 70 % původní hodnoty (obr. 3-17 a 3-20).

3.2.3 Porovnaní vlivu UVA a UVC záření

Různé vlnové délky vyvolávají různé typy a stupně poškození DNA. Poškození DNA způsobené UVA zářením je mnohokrát menší než poškození vyvolané UVC zářením. UVA záření vyvolává tvorbu reaktivních kyslíkových forem, které způsobují oxidativní poškození DNA.

Připravený dsDNA/UTGE biosenzor byl vystaven UVA záření o vlnové délce 365 nm po dobu expozice (t_{exp}) 2, 5, 10 a 20 min a vliv záření byl sledován metodami SWV, CV a EIS. Relativní odezvy biosenzoru jsou ukázány na obr. 3-21. Z nich je patrné, že ani v jednom případě neklesá průměrná odezva biosenzoru pod 90 %. Pravděpodobně při vlnové délce 365 nm dochází jen k drobným poškozením dsDNA přímým fotochemickým mechanismem. To potvrzuje, že UVA záření poškozuje dsDNA, ale jeho vliv je významně menší než vliv UVC záření, což je dáno především nižší schopností DNA absorbovat záření o vyšších vlnových délkách.



Obr. 3-21. Závislost relativních odezev biosenzoru (S_{rel}) vypočítaných z SWV píků guanosinu (1), $I_{p,a}$ (2) a $I_{p,k}$ (3) $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ při CV a R_{CT} (4) $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ při EIS na době expozice (t_{exp}) dsDNA/UTGE biosenzoru UVA záření o vlnové délce 365 nm; $n = 3$.

4 Závěr

V předložené diplomové práci byla provedena optimalizace přípravy dsDNA/UTGE biosenzoru a elektrochemická detekce poškození DNA způsobeného UV zářením (konkrétně zářením typu UVC a UVA). Biosenzor byl založen na elektrodě z ultračistého grafitu (UTGE) a nízkomolekularní dvouvláknové DNA (dsDNA) z lososích spermií imobilizované na povrch elektrody akumulací za konstantního potenciálu. Pomocí cyklické voltametrie (CV) a elektrochemické impedanční spektroskopie (EIS) byl charakterizován povrch elektrody.

UV záření způsobuje poškození DNA, které vede ke strukturním a degradačním změnám DNA. Pro detekci poškození DNA UV zářením byl použit dsDNA/UTGE biosenzor. Míra poškození byla stanovena pomocí metod CV a EIS s použitím redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ a detekce oxidace nukleových bází pomocí metody square-wave voltametrie (SWV). Poškození DNA bylo pozorováno na dsDNA/UTGE biosenzoru pomocí poklesu výšky píku guanosinu metodou SWV, pomocí změny voltametrické odezvy (výšek anodického a katodického píku) redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ metodou CV a pomocí změny odporu přenosu náboje $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ při metodě EIS. Získané výsledky potvrdily, že UV záření způsobuje poškození a degradaci DNA – dochází k oxidaci bází, vznikají oxidační adukty a jednořetězcové zlomy. Rovněž bylo zjištěno, že UVA záření poškozuje dsDNA významně méně než záření UVC a že celková míra poškození dsDNA je úměrná i zmenšující se vzdálenosti biosenzoru od zdroje záření.

Nově připravený dsDNA/UTGE biosenzor vykazuje za oproti dříve popsanému DNA biosenzoru na bázi elektrody ze skelného uhlíku (dsDNA/GCE)[66,67] vyšší citlivost při detekci poškození dsDNA za stejných podmínek a za stejného průměru disku použité pracovní elektrody. Výšky SWV píků guanosinu a adenosinu nepřevyšovaly hodnotu 13 μA na dsDNA/GCE (pík guanosinu na dsDNA/UTGE dosahuje v naší práci výšky přibližně 37 μA, což je výška téměř třikrát vyšší) a odezva redoxního indikátoru $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ při CV byla přibližně dvakrát lepší na dsDNA/UTGE v porovnaní s dsDNA/GCE.

5 Literatura

1. T. Yagura, A.P. Schuch, C.C.M. Garcia, et al. Direct participation of DNA in the formation of singlet oxygen and base damage under UVA irradiation. *Free Radical Biology and Medicine* **2017**, 108, 86–93.
2. F. El Ghissassi, R. Baan, K. Straif, et al. A review of human carcinogens—Part D: radiation. *The Lancet Oncology* **2009**, 10 (8), 751–752.
3. Y. Jiang, M. Rabbi, M. Kim, et al. UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. *Biophysical Journal* **2009**, 96 (3), 1151–1158.
4. P.-M. Girard, M. Pozzebon, F. Delacôte, et al. Inhibition of S-phase progression triggered by UVA-induced ROS does not require a functional DNA damage checkpoint response in mammalian cells. *DNA Repair* **2008**, 7 (9), 1500–1516.
5. A.P. Schuch, T. Yagura, K. Makita, et al. DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2012**, 53 (3), 198–206.
6. E. Sage, P.-M. Girard, S. Francesconi. Unravelling UVA-induced mutagenesis. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2012**, 11 (1), 74–80.
7. E. Rehlues. Global solar UV index: a practical guide.; World Health Organisation, **2002**.
8. A. Proykova, T. Samaras, R.M. Ion. Opinion on biological effects of ultraviolet radiation relevant to health with particular reference to sunbeds for cosmetic purposes; European Commission, Luxembourg, **2016**.
9. Tropospheric Emission Monitoring Internet Service (TEMIS) http://www.temis.nl/uvradiation/.
10. R.B. Setlow. The Wavelengths in Sunlight Effective in Producing Skin Cancer: A Theoretical Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1974**, 71 (9), 3363–3366.
11. B.L. Diffey, C.T. Jansen, F. Urbach, H.C. Wulf. Erythema reference action spectrum and standard erythema dose; International Comission on Illumination, **1998**.
12. E.S. Pérez. Efektivní fotoprotekce. *Praktické lékárenství* **2012**, 187–189.
13. P. Autier, M. Boniol, P. Boyle, J. Daniel. Exposure to artificial UV radiation and skin cancer, Repr.; International Agency for Research on Cancer, Ed.; IARC working group reports; International Agency for Research on Cancer, Lyon, **2008**.
14. S. Mouret, C. Philippe, J. Gracia-Chantegrel. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA: a direct photochemical mechanism? *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, 8 (7), 1706.
15. D.E. Godar, R.J. Landry, A.D. Lucas. Increased UVA exposures and decreased cutaneous vitamin D3 levels may be responsible for the increasing incidence of melanoma. *Medical Hypotheses* **2009**, 72 (4), 434–443.

16. A. Agrawal, E. Shindell, F. Jordan, et al. UV radiation increases carcinogenic risks for oral tissues compared to skin. *Photochemistry and Photobiology* **2013**, 89 (5), 1193–1198.
17. J. Breger, L. Baeva, A. Agrawal, E. Shindell, D.E. Godar. UVB-induced inflammatory cytokine release, DNA damage and apoptosis of human oral compared with skin tissue equivalents. *Photochemistry and Photobiology* **2013**, 89 (3), 665–670.
18. H. Swalwell, J. Latimer, R.M. Haywood, M.A. Birch-Machin. Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free Radical Biology and Medicine* **2012**, 52 (3), 626–634.
19. B. Cortat, C.C.M. Garcia, A. Quinet, et al. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2013**, 12 (8), 1483–1495.
20. C.L. Benjamin, S.E. Ullrich, M.L. Kripke, H.N. Ananthaswamy. p53 tumor suppressor gene: a critical molecular target for UV induction and prevention of skin cancer. *Photochemistry and Photobiology* **2007**, 84, 55–62.
21. W. Bäumler, J. Regensburger, A. Knak, A. Felgenträger, T. Maisch. UVA and endogenous photosensitizers – the detection of singlet oxygen by its luminescence. *Photochemical & Photobiological Science* **2012**, 11 (1), 107–117.
22. T.M. Rünger, B. Farahvash, Z. Hatvani, A. Rees. Comparison of DNA damage responses following equimutagenic doses of UVA and UVB: a less effective cell cycle arrest with UVA may render UVA-induced pyrimidine dimers more mutagenic than UVB-induced ones. *Photochemical & Photobiolodical Sciences* **2012**, 11 (1), 207–215.
23. P.M. Girard, S. Francesconi, M. Pozzebon, et al. UVA-induced damage to DNA and proteins: direct *versus* indirect photochemical processes. *Journal of Physics: Conference Series* **2011**, 261 (1), 2–12.
24. S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, et al. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, 103 (37), 13765–13770.
25. A.P. Schuch, C.F.M. Menck. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2010**, 99 (3), 111–116.
26. A.J. Ridley, J.R. Whiteside, T.J. McMillan, S.L. Allinson. Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *International Journal of Radiation Biology* **2009**, 85 (3), 177–195.
27. F.R. de Gruijl, H. Rebel. Early events in UV carcinogenesis—DNA damage, target cells and mutant p53 foci. *Photochemistry and Photobiology* **2008**, 84 (2), 382–387.
28. S.A. Oladepo, G.R. Loppnow. The effect of tryptophan on UV-induced DNA photodamage. *Photochemistry and Photobiology* **2010**, 86 (4), 844–851.

29. S.G. Nair, G.R. Loppnow. Multiplexed, UVC-induced, sequence-dependent DNA damage detection. *Photochemistry and Photobiology* **2013**, 89 (4), 884–890.
30. K.M. de Lima-Bessa, M.G. Armelini, V. Chiganças, et al. CPDs and 6-4PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA Repair* **2008**, 7 (2), 303–312.
31. W. Horspool, F. Lenci. CRC handbook of organic photochemistry and photobiology, Second Edition.; **2004**.
32. D. Markovitsi, T. Gustavsson, A. Banyasz. Absorption of UV radiation by DNA: spatial and temporal features. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2010**, 704 (1–3), 21–28.
33. A. Banyasz, I. Vayá, P. Changenet-Barret, et al. Base pairing enhances fluorescence and favors cyclobutane dimer formation induced upon absorption of UVA radiation by DNA. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (14), 5163–5165.
34. H. Ikehata, T. Ono. The mechanisms of UV mutagenesis. *Journal of Radiation Research* **2011**, 52 (2), 115–125.
35. A. Pierzyńska-Mach, A. Szczurek, F. Cella Zanacchi, et al. Subnuclear localization, rates and effectiveness of UVC-induced unscheduled DNA synthesis visualized by fluorescence widefield, confocal and super-resolution microscopy. *Cell Cycle* **2016**, 15 (8), 1156–1167.
36. A. Quinet, A.T. Vessoni, C.R.R. Rocha, et al. Gap-filling and bypass at the replication fork are both active mechanisms for tolerance of low-dose ultraviolet-induced DNA damage in the human genome. *DNA Repair* **2014**, 14, 27–38.
37. A.C.T. Silva-Júnior, L.M.B.O. Asad, I. Felzenszwalb, N.R. Asad. Mutagenicity induced by UVC in *Escherichia coli* cells: Reactive oxygen species involvement. *Redox Report* **2011**, 16 (5), 187–192.
38. A.F. El-Yazbi, G.R. Loppnow. Detecting UV-induced nucleic-acid damage. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, 61, 83–91.
39. J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2011**, 711 (1–2), 3–12.
40. J. Cadet, T. Douki. Oxidatively generated damage to DNA by UVA radiation in cells and human skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2011**, 131 (5), 1005–1007.
41. J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, 49 (1), 9–21.
42. J. Cadet, J.R. Wagner. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2013**, 5 (2), 1–18.
43. J. Cadet, T. Douki, J.-L. Ravanat, P. Di Mascio. Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2009**, 8 (7), 903–911.

44. H. Ikehata, K. Kawai, J. Komura, et al. UVA1 genotoxicity is mediated not by oxidative damage but by cyclobutane pyrimidine dimers in normal mouse skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2008**, 128 (9), 2289–2296.
45. P. Karran, R. Brem. Protein oxidation, UVA and human DNA repair. *DNA Repair* **2016**, 44, 178–185.
46. J. Cadet, S. Mouret, J.-L. Ravanat, T. Douki. Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions. *Photochemistry and Photobiology* **2012**, 88 (5), 1048–1065.
47. J. Cadet, S. Loft, R. Olinski, et al. Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. *Free Radical Research* **2012**, 46 (4), 367–381.
48. P.C. Joshi, T.C. Keane. Investigation of riboflavin sensitized degradation of purine and pyrimidine derivatives of DNA and RNA under UVA and UVB. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, 400 (4), 729–733.
49. S. Premi, S. Wallisch, C.M. Mano, et al. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science* **2015**, 347 (6224), 842–847.
50. P.C. Dedon. The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. *Chemical Research in Toxicology* **2008**, 21 (1), 206–219.
51. N.Y. Tretyakova, A. Groehler, S. Ji. DNA–protein cross-links: formation, structural identities, and biological outcomes. *Accounts of Chemical Research* **2015**, 48 (6), 1631–1644.
52. T. Douki, A. Reynaud-Angelin, J. Cadet, E. Sage. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* **2003**, 42 (30), 9221–9226.
53. L.J. Eccles, P. O'Neill, M.E. Lomax. Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: Friend or foe? *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2011**, 711 (1–2), 134–141.
54. S.M. Holt, J.-L. Scemama, M.I. Panayiotidis, A.G. Georgakilas. Compromised repair of clustered DNA damage in the human acute lymphoblastic leukemia MSH2-deficient NALM-6 cells. *Mutation Research* **2009**, 674 (1–2), 123–130.
55. R. Greinert, B. Volkmer, S. Henning, et al. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Research* **2012**, 40 (20), 10263–10273.
56. K. Wischermann, S. Popp, S. Moshir, et al. UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene* **2008**, 27, 4269–4280.
57. M. Sánchez-Flores, E. Pásaro, S. Bonassi, B. Laffon, V. Valdiglesias. γH2AX assay as DNA damage biomarker for human population studies: defining experimental conditions. *Toxicological Sciences* **2015**, 144 (2), 406–413.

58. E. Mladenov, G. Iliakis. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2011**, 711 (1–2), 61–72.
59. T.M. Rünger, U.P. Kappes. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA): mutation formation with UVA. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **2008**, 24 (1), 2–10.
60. P.L. Ståhl, H. Stranneheim, A. Asplund. Sun-induced nonsynonymous p53 mutations are extensively accumulated and tolerated in normal appearing human skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2011**, 131 (2), 504–508.
61. X.X. Huang, F. Bernerd, G.M. Halliday. Ultraviolet A within sunlight induces mutations in the epidermal basal layer of engineered human skin. *The American Journal of Pathology* **2009**, 174 (4), 1534–1543.
62. G.H. Francis George Thomas. Introduction to voltammetric analysis: theory and practice; **2001**.
63. A. Hájková, J. Barek, V. Vyskočil. Electrochemical DNA biosensor for detection of DNA damage induced by hydroxyl radicals. *Bioelectrochemistry* **2017**, 116, 1–9.
64. A.M. Oliveira-Brett, J.A.P. Piedade, L.A. Silva, V.C. Diculescu. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Analytical Biochemistry* **2004**, 332 (2), 321–329.
65. V. Diculescu, A.-M. Paquim, A.M. Brett. Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage. *Sensors* **2005**, 5 (6), 377–393.
66. V. Svitkova, J. Blaskovicova, M. Tekelova, et al. Assessment of CdS quantum dots effect on UV damage to DNA using a DNA/quantum dots structured electrochemical biosensor and DNA biosensing in solution. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, 243, 435–444.
67. L. Hlavata, I. Striesova, T. Ignat, et al. An electrochemical DNA-based biosensor to study the effects of CdTe quantum dots on UV-induced damage of DNA. *Microchimica Acta* **2015**, 182 (9–10), 1715–1722.