

NOVÉ SMĚRY V ELEKTROCHEMII BIOMAKROMOLEKUL: STRUČNÝ PŘEHLED A DISKUSE

JAN VACEK^{a,*}, DAVID NOVÁK^a a MARTINA ZATLOUKALOVÁ^{a,b}

^a Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc, Česká republika, ^b Faculty of Chemistry, Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw, Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warsaw, Poland
jan.vacek@upol.cz

Došlo 30.1.17, přijato 3.3.17.

Klíčová slova: bioelektrochemie, elektrody, modifikované povrchy, DNA, proteiny, biomembrány

Obsah

1. Úvod
2. Interakce biomolekul s povrchy elektrod
3. Elektroanalýza biopolymerů
 - 3.1. Nukleové kyseliny
 - 3.2. Proteiny
4. Transportní jevy a lipidové systémy
5. Nová technická řešení
6. Závěr a budoucí perspektivy

1. Úvod

Elektrochemické metody jsou široce využívány v základním fyzikálně-chemickém výzkumu a nacházejí aplikace v analytické chemii, dnes především ve vývoji nových čidel (senzorů) a v miniaturizované laboratorní technice pracující jak ve stacionárním, tak i průtočném režimu. Od druhé poloviny 20. století byly elektrochemické přístupy aplikovány ve své plné šíři pro účely biochemického a biofyzikálního výzkumu, což vedlo ke vzniku samostatné disciplíny „bioelektrochemie“ a r. 1979 vyústilo v založení mezinárodní odborné společnosti „Bioelectrochemical Society“ (<http://www.bioelectrochemical-soc.org>). Předkládaný text si klade za cíl seznámit čtenáře s aktuálními trendy v elektrochemii biopolymerů. Ambicí autorů není poskytnout vyčerpávající přehled současného

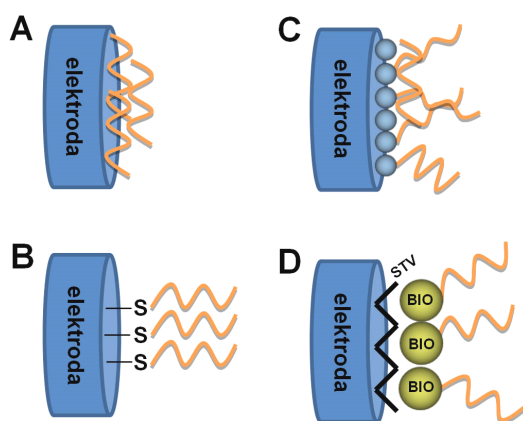
poznání, naopak předložený text se věnuje vybraným oblastem zájmu a podrobuje je diskusi a kritickému zhodnocení. V Chemických listech bylo o bioelektrochemii (konkrétně o elektrochemii nukleových kyselin) referováno v roce 2011, 2014 a 2015 (cit. ^{1–4}). Předložený text se snaží o komplexnější pohled a může posloužit k základní orientaci nejenom výzkumným pracovníkům, ale i studentům.

2. Interakce biomolekul s povrchy elektrod

Většina biomolekul (zvláště biomakromolekul) se vyznačuje schopností fyzikální sorpce (adsorpce) na povrchy pracovních elektrod (obr. 1A). V jiném případě, pokud dochází k vytvoření kovalentní vazby mezi imobilizovanými molekulami a samotným povrchem elektrody, hovoříme o procesu chemisorpce (obr. 1B). To, jakým způsobem biomolekula interaguje s povrchem elektrody, představuje v elektrochemii základní problém a předurčuje výsledek experimentu či konkrétní analýzy⁵.

Prostá adsorpce je ve vodném prostředí primárně řízena hydrofobními interakcemi, které mohou být při otevřeném proudovém obvodu ovlivněny dalšími typy nekovalentních interakcí. Jako příklad lze uvést mezimolekulové elektrostatické odpuzování adsorbované jednovláknové DNA. Adsorbovaná struktura DNA nese negativní náboj a vzniklé elektrostatické (–/–) repulze lze kompenzovat změnou koncentrace opačně nabitých iontů rozpouštědla, ze kterého adsorpce probíhá⁶. Tímto způsobem můžeme ovlivňovat hustotu pokrytí povrchu elektrody (obr. 2A). Nejenom pro účely elektrochemického výzkumu, ale i pro celou řadu technologických aplikací, je klíčová regulace tvorby a výsledné vlastnosti adsorbované vrstvy. Ta může být tvořena molekulární monovrstvou nebo i vysoce heterogenním adsorbátem. První organizované systémy na bázi chemisorpce byly založeny na vazbě alkanthiolů na povrchu zlata⁷. Tyto postupy se staly základem technologie tvorby samoskladných vrstev (SAM, angl. self-assembled monolayer), které byly později aplikovány pro funkcionalizaci či pasivaci různých kovových materiálů (obr. 1B). Jednotné orientace biomolekul na površích lze docílit nejenom chemisorpcí, ale i samotnou úpravou fyzikálně-chemických vlastností povrchu elektrody a volbou vhodného prostředí, ze kterého adsorpce probíhá⁸. Zajímavým fenoménem je uspořádání molekul vlivem elektrického pole, což bylo demonstrováno v případě nukleových bází

* Jan Vacek je laureátem Ceny Metrohm za nejlepší práci mladého elektroanalytického chemika v roce 2015.

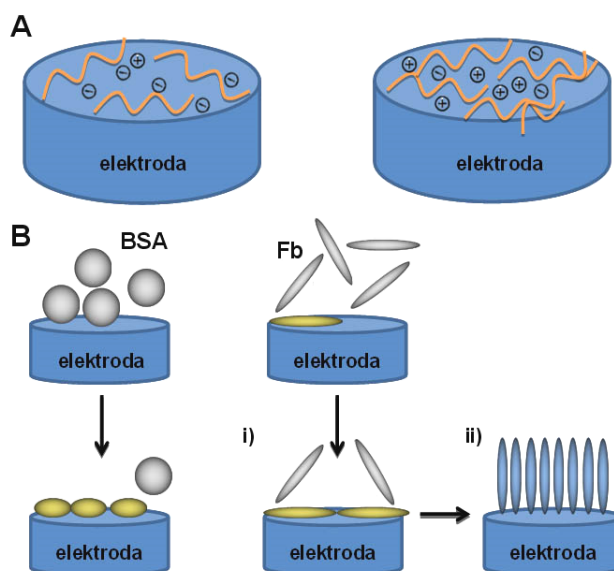


Obr. 1. **Různé typy imobilizace biopolymeru na povrchu elektrody.** Elektroda může být modifikována pomocí fyzikální sorpce (adsorpce) biomakromolekuly na její povrch, v tomto případě obvykle dochází k tvorbě značně heterogenní adsorbované vrstvy (A). Studované molekuly koncově značené –SH skupinami mohou vytvářet na povrchu kovových materiálů (chemisorpce) vysoce organizovanou monovrstvu (B). Biopolymer může reagovat s elektrodou prostřednictvím vodivého polymeru nebo jiné struktury (např. uhlíkové nanočástice) schopné přenášet elektrony (C). DNA nebo enzym koncově značený biotinem (BIO) se může vázat na streptavidin (STV), který je imobilizován na povrchu elektrody (D)

adsorbovaných na povrch rtuťové elektrody. Tímto způsobem může za vhodně zvolených experimentálních podmínek docházet k tvorbě 2D kondenzovaných vrstev⁹.

Na základě výše popsaných principů lze prostou difuzí z roztoku nebo i konvekci (mícháním) dopravit zkoumané molekuly z roztoku na povrch elektrody. K selektivnímu rozpoznávání analytů potom slouží následující přístupy. Mezi nejjednodušší patří chemická modifikace (např. oxidace) povrchu pracovní elektrody¹⁰. Povrch elektrody může být modifikován i jiným materiálem či polymerem, který přispívá nejenom k selektivní interakci zkoumaných molekul s povrchem elektrochemického senzoru, ale i ke zlepšení vodivostních či jiných vlastností elektrody (obr. 1C). Vývoj těchto experimentálních přístupů podlehl v posledních letech tendenci vytvářet značně komplexní uspořádání, které obvykle vychází z kombinace hned několika organických a anorganických vrstev imobilizovaných na povrch elektrody. Míra komplexity, resp. složitosti modifikace by ovšem neměla (s ohledem na reprodukovatelnost přípravy) překročit rozumnou mez. Složitější přístupy jsou založeny na bioafinitním principu. Typickým příkladem je tvorba vysoce stabilního komplexu streptavidin-biotin (obr. 1D) nebo využití imunoafinitní reakce, tj. imobilizované monoklonální protilátky nebo aptameru (viz cit.¹¹) schopných selektivně vázat cílové molekuly proteinů nebo jiného antigenu (přesněji epitopu) z matrice analyzovaného vzorku.

Adsorpce nízkomolekulárních sloučenin v zásadě přímo neovlivňuje jejich strukturu, i když fyzikálně-chemické vlastnosti molekul adsorbátu se mohou lišit ve



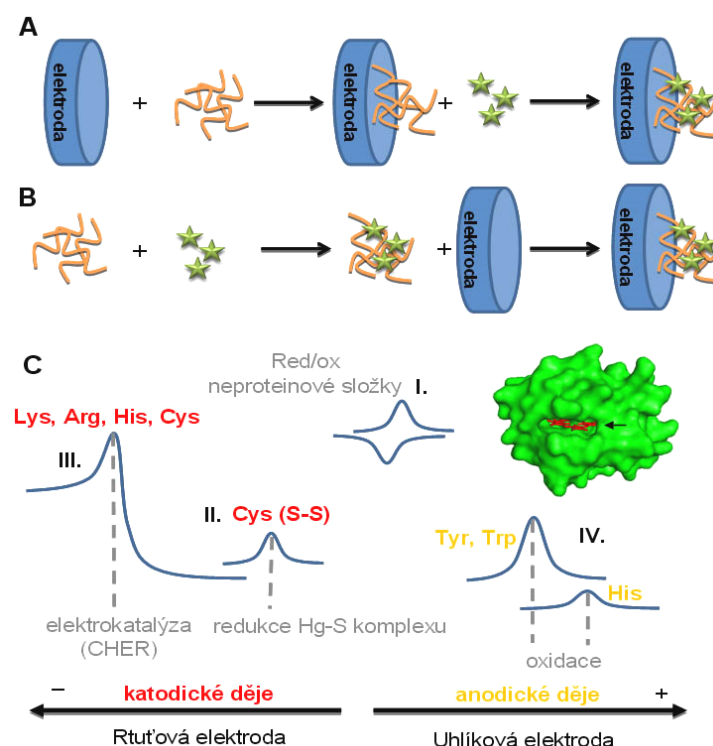
Obr. 2. (A) Různé hustoty pokrytí elektrody negativně nabitou jednovláknovou DNA v přítomnosti nízké (vlevo) a vysoké (vpravo) koncentrace opačně nabitých iontů. (B) Schematické zobrazení adsorpce globulárního proteinu (telecí sérový albumin, BSA) kde v důsledku interakce proteinu s povrchem dochází k lokálním konformačním změnám (vlevo). Vpravo je znázorněna adsorpce fibrilární bílkoviny (fibrinogen, Fb), která nejprve vytváří značně heterogenní (i) adsorbovanou vrstvu a posléze přechází (ii) do uspořádané populační konformace v důsledku protein-protein interakcí. Další detaily viz cit.¹²

srovnání se systémem solutu. V případě vysokomolekulárních látek vč. biopolymerů a biologicky relevantních vysokomolekulárních systémů (lipozomů nebo buněčných organel) je situace přesně opačná. Uvedené si můžeme přiblížit pomocí srovnávací studie¹², jejíž autoři zkoumali interakci globulárního (telecí sérový albumin) a fibrilárního (fibrinogen) proteinu s povrchem zlata, který byl modifikován různě hydrofobní SAM (obr. 2B). Adsorpce albuminu (molekula je sférického tvaru) je obvykle spojena s lokální strukturální změnou v místě kontaktu molekul s povrchem materiálu, obr. 2B, vlevo. Naopak v případě fibrinogenu (molekula je tyčinkovitého tvaru) můžeme pozorovat víceřadový průběh adsorpce, který za vhodně zvolených podmínek experimentu vede k ustálené orientaci molekul na povrchu zlata, obr. 2B vpravo. V takto vytvořené adsorbované vrstvě se uplatňují mezimolekulové interakce fibrinogenu, které kompenzují jeho další interakce s povrchem, a nedochází tak ke konformačním změnám proteinu. Konformačním změnám proteinu (ale i dalších biomakromolekul) lze zabránit modifikací povrchu elektrod vrstvou organického filmu¹³ nebo imobilizací proteinu do matrice vodivého polymeru, lipidového filmu nebo i aplikací amfifilních molekul¹⁴. Vždy je nutné rozlišit adsorpci či imobilizaci cílových molekul na povrch elektrody při otevřeném proudovém obvodu od procesů probí-

hajících na elektricky nabitěm povrchu. V případě polarizace elektrody podléhají adsorbované vrstvy reorientačním či desorpčním dějům a u biomakromolekul obvykle dochází k destabilizaci nebo úplné ztrátě jejich struktury. Uvedené bylo demonstrováno v případě DNA¹⁵, proteinů^{13,16} a vysokomolekulárních membránových systémů¹⁷ adsorbovaných na negativně nabitých elektrodových površích.

3. Elektroanalýza biopolymerů

Elektrochemické zkoumání biopolymerů se významně podílelo na vzniku a formování oboru bioelektrochemie jako takové. Elektrochemické metody jsou intenzivně využívány ve výzkumu struktury a interakcí nukleových kyselin (NK) a proteinů. Další biopolymery a biologicky významné makromolekulární struktury, jako jsou polysacharidy nebo lipidové komplexy, obvykle nejsou elektrochemicky aktivní. Uvedené nemusí být nevýhodou (jak bude ukázáno v následujícím oddíle) a k jejich selektivní analýze lze využít elektrochemicky aktivní značky. Značení je většinou založeno na vytvoření kovalentní vazby mezi cílovou molekulou a nízkomolekulární značkou a může být aplikováno nejenom pro analýzu elektrochemicky neaktivních biopolymerů, ale i pro konstrukci DNA hybridů-



Obr. 3. Elektrochemie biopolymerů. Na panelech (A) a (B) jsou ukázány dva základní přístupy jak zkoumat mezimolekulové interakce DNA s nízkomolekulárním ligandem (znázorněn hvězdičkou). (C) Katodické (vlevo) a anodické (vpravo) elektrochemické odezvy proteinů. Vložena je také struktura cytochromu c (PDB: 2B4Z) s dobře rozpoznatelnou neproteinovou (hemovou) složkou skrytou v kavitě (naznačeno šipkou). Struktury byly zpracovány v programu PyMOL (Molecular Graphics System, ver. 1.6.0.0, Schrödinger)

začnících senzorů a nebo k amplifikaci elektrochemického signálu proteinu, který neobsahuje dostatek elektrochemicky aktivních aminokyselinových zbytků. V předloženém textu se budeme věnovat redukci a oxidaci nativní DNA a proteinů (angl. label-free techniques), jelikož tyto přístupy nacházejí širší využití právě ve výzkumu jejich struktury a funkce. Pro další studium doporučujeme recentně uveřejněné monografie zaměřené jak na elektroanalýzu DNA⁶, tak i proteinů¹⁸.

Elektrochemická analýza je vhodná pro sledování interakcí DNA a proteinů s nízkomolekulárními ligandy. Takové analýzy lze provést v zásadě dvěma způsoby. Interakce mezi biopolymerem a danou látkou může probíhat přímo na povrchu pracovní elektrody. V takovém případě je nejprve elektroda modifikována biopolymerem (např. DNA) a následně je biosenzor (tedy modifikovaná elektroda) ponořen do roztoku s nízkomolekulárním ligandem. Po inkubaci je provedena elektrochemická analýza (obr. 3A). Druhou možností je provést nejprve inkubaci ligandu s DNA nebo proteinem v roztoku a vytvořené komplexy adsorbovat na povrchy elektrod a podrobit je elektrochemické analýze (obr. 3B). První z uvedených přístupů přináší riziko strukturní změny biopolymeru po jeho adsorpci na povrch pracovní elektrody, a to ještě před jeho asociací s vazebným ligandem. Pro fundamentální (mechanistické) studie je proto vhodnější použít druhý z výše zmíněných přístupů. Studované interakce nebo vyvolané strukturní změny biopolymeru se mohou projevit změnou v jeho měřených elektrochemických signálech. Naopak pro určení stechiometrie nebo kinetických parametrů dané interakce můžeme sledovat elektrochemické odezvy navázaného ligandu.

3.1. Nukleové kyseliny

K elektroanalýze biopolymerů je nutné, aby jejich molekuly (nebo navázané elektroaktivní značky) byly schopny výměny elektronů s pracovní elektrodou, případně, aby se na povrchu elektrody specifickým způsobem adsorbovaly. DNA tuto podmínku splňuje, přičemž z jejích strukturních komponent jsou elektrochemicky redukovatelné adenin, cytosin a guanin, a to na povrchu rtuťových elektrod¹⁹. Naproti tomu na povrchu elektrod uhlíkových lze elektrochemicky preferenčně oxidovat purinové báze, adenin a guanin²⁰. NK jsou na elektrodových površích v širokém rozmezí potenciálů silně adsorbovány. Adsorpčně-desorpční děje, kterým podléhají polymerní struktury NK na rtuťových elektrodách při vkládání negativních potenciálů, dávají vzniknout tzv. tenzametrickým (kapacitním) píkům, které poskytují řadu cenných informací o struktuře adsorbovaných molekul²¹. Charakter tenzametrické odezvy závisí na tom, které strukturní komponenty DNA se adsorpčně-desorpčních dějů účastní. Z výše popsaného vyplývá, že elektrochemické chování NK je závislé na tom, do jaké míry mohou jejich strukturní komponenty komunikovat s povrchem elektrody, ať již formou přenosu elektronů (redukce, oxidace), nebo formou adsorpčně-desorpčních procesů. Expozice nukleovýchází

povrchu elektrody je přímo závislá na struktuře DNA a taktéž na přítomnosti interagujících látek (např. interkalčních činidel^{22,23}) ve studovaném vzorku. U dvouvláknové DNA jsou nukleové báze skryty uvnitř dvoušroubovice a nemohou volně komunikovat s okolím, tudíž ani s povrchem elektrody. Naproti tomu v denaturované (jednořetězcové) DNA jsou báze volně přístupné. V důsledku toho se elektrochemické odezvy nativní a denaturované DNA za vhodně zvolených podmínek analýzy výrazně liší. Jakmile tedy dochází ke změně struktury DNA, projeví se to na jejích elektrochemických odezvách^{15,21,24}. Na základě toho je možné pozorovat odvíjení dvoušroubovice, tvorbu zlomů (tj. přerušení cukrfosfátové páteře DNA) a různé lokální strukturní změny dvoušroubovice spojené s interakcí či poškozením DNA. Měření na rtuťových elektrodách umožňují sledovat malé změny ve struktuře DNA s vysokou citlivostí⁶. Naproti tomu oxidační signály purinovýchází na uhlíkových elektrodách jsou ke struktuře DNA méně citlivé. Uhlíkové elektrody jsou naopak vhodné pro sledování interakcí nízkomolekulárních ligandů se zbytky guaninu a adeninu a mohou taktéž posloužit k analýzám oxidačního poškození DNA⁶.

3.2. Proteiny

Proteiny jsou tvořeny z 21 biogenních aminokyselin, z nichž jsou pro elektrochemickou analýzu významné především cystein, tyrosin a tryptofan. Zastoupení zbytků těchto aminokyselin se v jednotlivých proteinech výrazně liší, na rozdíl od relativního zastoupení elektroaktivníchází v DNA. Kromě toho existují složené proteiny, které obsahují další oxidačně-redukčně aktivní centra neproteinové povahy, např. hem ve struktuře cytochromu c (struktura viz obr. 3C). Tyto proteiny se vyznačují jedinečnou elektrochemickou aktivitou korespondující s reverzibilní přeměnou neproteinové složky (obr. 3C-I) a byly v uplynulých desetiletích intenzivně studovány^{25–28}. Posloužily především jako vhodné modely pro výzkum přenosu elektronů v biopolymerech, což je klíčový jev pro bioenergetické procesy, jako je dýchání nebo fotosyntéza. Moderní elektrochemické přístupy však nabízejí řadu možností ve výzkumu (nekonjugovaných) proteinů, které oxidovatelné nebo redukovatelné prostetické skupiny neobsahují¹⁸.

Pro elektrochemické chování proteinů na rtuťových elektrodách je klíčová přítomnost zbytků cysteinu, případně cystinu, který je dimerem cysteinu vzniklým oxidací thiolových skupin (-SH) na skupinu disulfidovou (-S-S-). Sirné aminokyseliny mají vysokou afinitu ke rtuti a velmi ochotně s ní reagují (chemisorpce) za vzniku Hg-S vazby, která je elektrochemicky redukovatelná²⁹ (obr. 3C-II). Potenciál a velikost píku odpovídající za tuto redukci závisí na obsahu zbytků cysteinu v molekule a na jejich přístupnosti k povrchu elektrody³⁰. Významné uplatnění v elektroanalýze proteinů a peptidů má tzv. Brdičkova reakce^{31,32}. Tento katalytický děj probíhá na rtuťových elektrodách v přítomnosti proteinů obsahujících zbytky cysteinu a v přítomnosti iontů kobaltu. Katalytickému

vyučování vodíku (angl. catalytic hydrogen evolution reaction, CHER) odpovídá vznik jedné nebo dvou polarografických vln nebo voltametrických piků. Jiným typem katalytických proudů, které jsou poskytovány proteiny a peptidy, je tzv. prenatriová vlna. Tento jev byl poprvé pozorován polarograficky v roztocích chloridu sodného (odtud jeho název), který obsahoval stopy proteinů krevního séra³³. Pro vznik prenatriové vlny není nutná přítomnost ani sirných aminokyselinových zbytků, ani iontů kobaltu či jiných kovů³⁴. Díky jejímu výskytu v oblasti vysoce negativních potenciálů nenalezla prenatriová vlna analytické využití. V posledních dvou desetiletích však bylo ukázáno^{35,36}, že při aplikaci moderních chronopotenciometrických technik³⁷ lze na místě prenatriové vlny získat dobře vyvinutý katalytický pik (obr. 3C-III), který může být využit v oblasti studia proteinů, a to nejenom proteinů rozpustných ve vodě, ale také membránových proteinů³⁸. Metoda nachází uplatnění při sledování změn struktury, agregace, denaturace, posttranslačních modifikací a interakcí proteinů s dalšími molekulami včetně DNA³⁹. Přestože bylo navrženo několik mechanismů této elektrokatalytické reakce, nebylo dosud zcela jasně prokázáno, které funkční skupiny jsou za proces vyučování vodíku (tj. CHER) zodpovědné. Pravděpodobně na reakci participují především zbytky cysteinu, argininu, lysinu a histidinu³⁹. Na uhlíkových elektrodách lze elektrochemicky oxidovat tyrosin, tryptofan^{40,41} nebo i cystein, histidin a methionin⁴² (obr. 3C-IV). V posledním desetiletí byly anodické přeměny zbytků tyrosinu a tryptofanu využity pro citlivé stanovení hned několika biologicky aktivních peptidů (hormony bombesin, neurotensin, angiotensin, vasopresin, insulin) a při studiu proteinů, včetně jejich agregace a dalších interakcí¹⁸. Jak uvádíme výše, využitelnost uhlíkových elektrod k analýze strukturních změn polymerních NK je výrazně nižší ve srovnání s rtuťovými elektrodami. Podobně je tomu i v případě analýzy strukturních změn proteinů. Recentní studie nicméně naznačují, že pokud je uhlíková elektroda vyrobena z vhodně zvoleného materiálu, může dojít k významnému zvýšení citlivosti, např. při analýzách denaturace sérového albuminu⁴³.

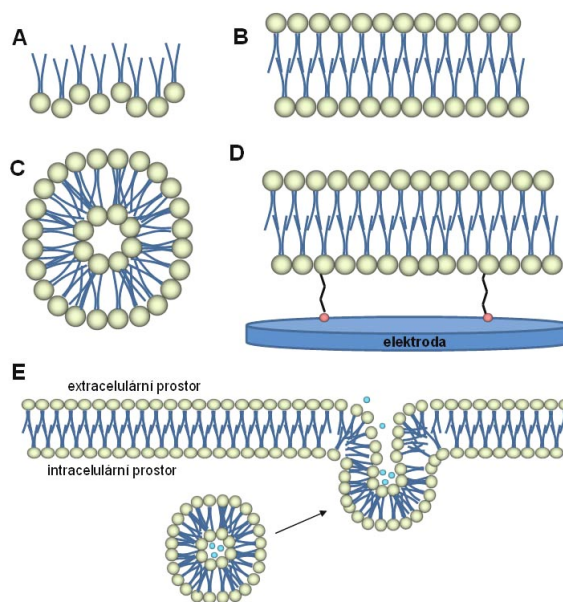
Ve srovnání s elektroanalýzou nízkomolekulárních látek se při elektrochemické analýze biopolymerů setkáváme s poměrně komplexní a mnohdy i obtížnou interpretací naměřených dat. Asi nejčastěji se lze setkat s uměle vytvořenými výsledky při studiu mezimolekulových interakcí DNA nebo proteinů s léčivými či toxiny. Zde je velmi důležité vhodně kombinovat metody elektrochemické s dalšími experimentálními přístupy, což někteří autoři opomíjejí⁴⁴. V odborné literatuře se také můžeme setkat s interpretací výsledků, které nezohledňují skutečnost, že elektrochemická analýza je provedena s molekulami v adsorbovaném stavu, u kterých mohou mezimolekulové interakce probíhat odlišně (např. kinetické parametry), než-li u procesů pozorovaných přímo v prostředí fyziologických roztoků a pufrů.

4. Transportní jevy a lipidové systémy

V předchozích dvou oddílech textu jsme popsali využitelnost a také limitace elektrochemických přístupů ve výzkumu biomakromolekul. Tento oddíl je věnován primárně lipidům, jejichž molekuly a nekovalentní asociáty (soustavy membrán) jsou za standardních experimentálních podmínek elektrochemicky neaktivní, tj. nelze je redukovat ani oxidovat. Membránové systémy plní v buňce bariérovou funkci a ve stejném smyslu je využíváme při elektroanalýze transportních jevů.

Pracujeme-li ve vodném prostředí, lipidové membrány (nebo i soustavy detergentů) interagují s elektrodovými povrchy primárně formou hydrofobních interakcí. Na základě amfifilních vlastností lipidů⁴⁵ je nutné počítat s tím, že iontové soustavy se mohou reorganizovat v případě polarizace elektrody, zejména pokud je elektroda nabitá kladně a je na ní imobilizován kladně nabitý lipid nebo detergent (+/+) a naopak (–/–). Jak je uvedeno výše, mezi elektrochemickými odezvami zkoumaných molekul a lipidovými elementy obvykle nedochází k analytické interferenci. Pouze může docházet v závislosti na zvolených experimentálních podmínkách ke kompetici mezi lipidy a další adsorbující se komponentou vzorku. Uvedené je výhodou, jelikož jak dispergované lipidy, tak i membrány ovlivňují výsledek optických spektrálních analýz, jelikož dochází k rozptylu elektromagnetického záření procházejícího zkoumaným roztokem.

V průběhu posledních let byly klasické lineární lipidové membrány a lipozomální modely (obr. 4A-C) rozší-



Obr. 4. Přehled membránových modelových systémů připravených v roztoku nebo na povrchu elektrody. (A) lipidová monovrstva, (B) lipidová dvojvrstva, (C) lipozom, (D) imobilizovaná (ukotvená) lipidová dvojvrstva bez přímého kontaktu s povrchem elektrody. (E) Schematické znázornění procesu exocytózy

řeny o více komplexní lipidové systémy, které byly vyvinuty pro účely rekonstituce membránových proteinů a jejich následnou krystalizaci pro účely RTG strukturní analýzy⁴⁶. Jedná se např. o lipidové nanodisky a lipidové kubické fáze, což jsou složité soustavy kanálů v lipidové gelové matici⁴⁷. Řada těchto lipidových objektů po interakci s pevným povrchem přechází do lineární formy a obecně na nabitých površích dochází k jejich reorganizaci či desintegraci. Tyto jevy byly detailně zkoumány např. v případě lipozomů adsorbovaných na povrch rtuťové elektrody⁴⁸. Rozrušení struktury membrán vlivem elektrického pole je z hlediska studia transportních jevů nežádoucí. Nicméně účinek intenzivních elektrických pulzů můžeme i cíleně využívat pro změnu permeability nebo destrukci cytoplasmatické membrány, např. při genových manipulacích založených na elektroporaci nebo v protinádorové terapii (pro další studium, viz cit.^{49,50}).

Pokud jde o aplikace v biochemii, asi nejjednodušší experimentální uspořádání je umístit elektrodu na jednu stranu membrány a v roztoku na opačné straně membrány rozpustit látku, jejíž transport přes membránu chceme zkoumat. Nebo můžeme imobilizovat lipidovou vrstvu na povrch elektrody a takto modifikovanou elektrodu můžeme ponořit do roztoku s látkou určenou k transportu⁵¹. Nemusí se vždy jednat o transport řízený difúzí, ale membrána může obsahovat i aktivní proteinový transportér. V takovém případě není vhodné, aby membrána imobilizovaná na povrch elektrody byla v těsném kontaktu s povrchem elektrody⁵². Z tohoto důvodu byly vyvinuty techniky, které umožňují imobilizovat membránu pomocí molekul selektivně se vážících jedním koncem na membránu a druhým koncem na povrch elektrody (angl. tethered bilayer lipid membranes)⁵³ (obr. 4D). Kromě pasivního a aktivního transportu nízkomolekulárních látek přes membránu může být elektrochemie využita k analýze afinity léčiv k povrchu membrán⁵⁴. Unikátní aplikací je využití mikroelektrod pro studium exocytózy. Exocytóza je proces, kterým buňky transportují látky, které obvykle nejsou schopny samostatného prostupu přes plasmatickou membránu, do svého okolí (obr. 4E). Pokud probíhá proces exocytózy, je možné substráty transportované vně prostoru buňky sledovat pomocí elektrochemických senzorů umístěných do těsného okolí buňky⁵⁵. Nedávno také bylo zjištěno, že proteiny rekonstituované v prostředí lipidových membrán (tzv. proteolipozomy) mohou být zkoumány pomocí elektrokatalytické reakce CHER a že proteiny integrované do systému lipozomů mohou být voltametricky oxidovány⁵⁶. Tohoto principu bude možné dále využívat při výzkumu elektrochemických přeměn, strukturní stability a mezimolekulových interakcí membránových proteinů. Obdobně můžeme využívat lipidové kubické fáze, do jejichž 3D matrice lze inkorporovat enzym⁵⁷. Takto připravenou matici lze imobilizovat na povrchu elektrody. Inkorporovaný enzym přeměňuje substrát na elektrochemicky aktivní produkt. Tato technika umožňuje zkoumat kinetické a mnohé další parametry enzymové katalýzy *in situ* v reálném čase.

5. Nová technická řešení

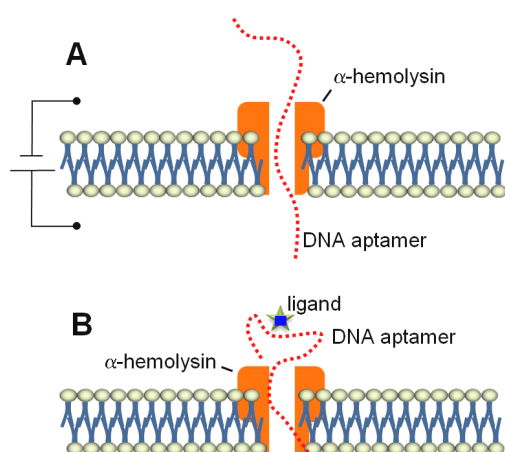
V posledních odstavcích tohoto textu se zaměříme na popis technologického pokroku a také limitací v případě elektrochemické instrumentace. Konstrukce nových (miniaturizovaných) detektorů a elektrodových materiálů, vylepšování softwarového vybavení⁵⁸ a aplikace nanotechnologií je dnes výchozím bodem pro vývoj nových analytických postupů využitelných v bioelektrochemii a příbuzných disciplínách.

I přes extenzivně vedený vývoj nových a optimalizace stávajících metod je v současnosti využitelnost elektroanalytických metod v biochemických oborech do jisté míry limitována. V 70. letech vstoupily elektrochemické metody do soutěže s optickými metodami detekce a došlo zčásti k jejich vytěsnění mimo metody rutině využívané v praxi. K obdobné situaci došlo koncem 90. let, kdy můžeme pozorovat významný pokrok v technikách hmotnostní spektrometrie, především v oblasti konstrukce nových ionizačních zdrojů vhodných pro analýzu biomakromolekul⁵⁹ a později zavedení DART (angl. direct analysis in real time) analyzátorů do analytické praxe⁶⁰.

V současnosti lze sledovat miniaturizaci elektrochemické instrumentace⁶¹, přechod k mikročipovým technologiím, kombinaci metod elektrochemických společně s metodami optickými (angl. bifunctional electro-optical approaches), aplikaci elektrochemicky indukované chemiluminiscence pro sledování biologicky aktivních molekul^{62,63} a byly zaznamenány významné pokroky v elektrochemických zobrazovacích metodách⁶⁴. Všechny vyjmenované oblasti zájmu směřují k analýze složitých makromolekulárních systémů, jednotlivých separovaných buněk a biochemických procesů probíhajících v jednotlivých subcelulárních kompartmentech.

Aplikace nanomateriálů a nanostrukturování povrchů prostupuje celou sférou fyzikální a materiálové chemie a je tomu tak i v případě bioelektrochemie. Elektrochemicky jsou studovány jednotlivé objekty mikrometrových a nanometrových rozměrů (dokonce i jednotlivé molekuly), k čemuž máme k dispozici instrumentaci, experimentální postupy a teorii v podobě stochastických modelů^{61,65}. Právě vývoj nových nanomateriálů, jako jsou nanotrubičky nebo grafen⁶⁶, představuje cestu, jak zkoumat oxidačně-redukční děje jednotlivých buněk a subcelulárních komponent. Magnetické nano- a mikročástice slouží k efektivní a cílené manipulaci se vzorky a k odstranění interferujících komponent při analýze biopolymerů⁶⁷. Po výčtu všech výhod je potřeba také upozornit na to, že nadměrná tendence aplikovat nanočásticové technologie v bioelektrochemii může být (a v řadě případů také je) vnímána jako samoúčelná, viz např. příprava vícevrstvých modifikací elektrodových povrchů.

V souvislosti s analýzou buněčných komponent a jednotlivých molekul se jako skutečně perspektivní jeví techniky založené na selektivním transportu pomocí nanopórů (angl. nanopore technology)⁶⁸. Tyto technologie jsou založeny na využití nanopórů jako elementu, který propouští pouze zkoumané molekuly a nikoli interferující



Obr. 5. Využití selektivního transportu k analýze interakce DNA s nízkomolekulárním ligandem. (A) Nativní DNA prochází nanopórem (α -hemolysin). (B) Po interakci ligandu s DNA dochází k strukturní změně a její průchod nanopórem ze sterických důvodů již není možný. Další detaily viz cit.⁶⁹

látky. Nanopóry mohou být součástí pevné (nebo i flexibilní polymerní) uměle vytvořené bariéry nebo je mohou tvořit proteiny (angl. biopores) lokalizované v lipidové dvojvrstvě⁶⁸. Jako vhodný proteinový transportér může posloužit α -hemolysin (velikost póru v nejužším místě je kolem 1,4 nm), který je schopen transportovat nativní oligonukleotidy ve formě DNA-aptameru¹¹ (obr. 5A). Pokud DNA interaguje s ligandem (např. molekulou kokainu⁶⁹), dochází k její strukturní změně a na základě sterické zábrany k její translokaci nanopórem nemůže dojít (obr. 5B). Propustnost nanopórů lze detegovat elektrochemicky (angl. ionic current blockage technique), pomocí elektronických součástek (tranzistorů) nebo pomocí skenovací tunelové mikroskopie (pro další studium viz cit.⁷⁰). Selektivita a průměr proteinových nanopórů mohou být modifikovány pomocí metod genové manipulace (tj. záměnou některých aminokyselin) a aplikovány v různých oblastech biochemie a molekulární biologie. Mezi ty nejefektivnější aplikace patří DNA sekvencování, které je založeno na průchodu zkoumané DNA nanopórem a jejím kontinuálním štěpením exonukleasami. Nukleové báze jsou detegovány během postupného štěpení polynukleotidového vlákna, v pořadí odpovídající sekvenci⁶⁸.

6. Závěr a budoucí perspektivy

Elektrochemické metody byly v posledních dekádách aplikovány v řešení celé řady biochemických problémů. Za zcela zásadní můžeme považovat pokroky v oblasti elektrochemie biopolymerů a jejich vysokomolekulárních komplexů s detergenty, lipidy a lipidovými membránami různé complexity. V případě, že zkoumané molekuly nejsou za daných experimentálních podmínek elektrochemicky aktivní, je možné provést jejich selektivní modifikaci

nebo navázání elektroaktivních značek^{71,72}. Elektrochemický výzkum biopolymerů může v budoucnosti také významně přispět k analýze dynamických jevů, jako je elektronový transport (přenos náboje) v molekule DNA dvoušroubovice⁷³ nebo protonové přenosy u peptidů a proteinů⁷⁴. Vedle elektrochemických přeměn probíhající na molekulární úrovni byla navržena řešení vysoce komplexních makro- a supramolekulárních redoxně aktivních systémů, např. biopalivové články⁷⁵, umělé fotosyntetické děje^{76,77} nebo molekulové motory a spínače (angl. molecular switches)⁷⁸.

Předpokládáme, že v budoucím výzkumu bude v bioelektrochemii sehrávat důležitou úlohu výpočetní chemie, především simulace interakce molekul s povrchy, uspořádání (organizace) adsorbovaných vrstev a jejich transformace v průběhu polarizace elektrody. Současný pokrok v metodologii molekulové dynamiky⁷⁹ naznačuje, že absence výpočetních přístupů, a tudíž i jejich aplikací v systému elektricky nabitý povrch-biomakromolekulární roztok bude velmi brzo substituována funkčními a reprodukovatelnými přístupy.

Elektrochemické metody sehrávají významnou úlohu ve výzkumu tvorby adsorbovaných vrstev a v imobilizaci biopolymerů a buněčných systémů na pevné nebo i flexibilní povrchy (angl. soft surfaces). Zcela unikátní roli zde sehrává i výzkum lipidových systémů a biomembrán. I přesto, že většina biochemických procesů je zkoumána v roztoku, samotné buněčné prostředí disponuje rozsáhlým systémem membránových a cytoskeletárních povrchů, kde mohou probíhat složité (katalyzované) chemické přeměny. Reaktivita biomolekul v roztoku není vždy stejná jako v adsorbovaném stavu nebo v interakci s biomembránou. Uvedený jev je biochemiky někdy opomíjen a elektrochemické metody lze v tomto smyslu vnímat jako významný příspěvek vedoucí k pochopení komplexních interakcí a transportních jevů, které ve fyziologickém prostředí probíhají.

V posledních dvou dekádách zaznamenal obor elektrochemie významné pokroky, které umožnily zkoumat multikomponentní biologické vzorky, izolované buněčné objekty a chemické entity za podmínek rozlišení jednotlivých molekul. Naznačili jsme zde ve stručnosti současný stav poznání a také uvedli některé kritické poznámky. Vývoj elektrochemického výzkumu v budoucnosti lze těžko předpovídat. Předpokládáme ale, že čeští (českoslovenští) vědci budou i nadále určovat trend v oboru bioelektrochemie, patří totiž k jeho zakladatelům^{80–82} a stále aktivně ovlivňují jeho směřování.

Autoři jsou zavázáni doc. Janu Hrbáčovi (Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně) a dr. Jiřímu Vrbovi (Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci) za diskusi a kritické připomínky k textu. Práce na rukopise byla finančně podpořena interním studentským projektem Univerzity Palackého v Olomouci č. IGA_LF_2017_11 a částečně také projektem Grantové agentury České republiky č. 14-08032S. Autorský kolektiv děkuje České společnosti chemické, prof. Jiřímu Barkovi

a dr. Peterovi Barathovi (společnost Metrohm Česká republika s.r.o.) za podporu mladých chemiků a za aktivity, které rozvíjí vzájemný dialog a spolupráci mezi elektrochemiky v České republice.

LITERATURA

1. Bartošík M.: Chem. Listy 108, 500 (2014).
2. Paleček E., Ostatná V., Pechan Z.: Chem. Listy 108, 490 (2014).
3. Vacek J., Havran L., Fojta M.: Chem. Listy 105, 15 (2011).
4. Vyskočil V., Hájková A.: Chem. Listy 110, 207 (2015).
5. Garland A., Shen L., Zhu X.: Progr. Surf. Sci. 87, 1 (2012).
6. Paleček E., Bartosik M.: Chem. Rev. 112, 3427 (2012).
7. Nuzzo R. G., Allara D. L.: J. Am. Chem. Soc. 105, 4481 (1983).
8. Vacek J., Vrba J., Zatloukalova M., Kubala M.: Electrochim. Acta 126, 31 (2014).
9. Hason S., Vetterl V.: J. Biochem. Tech. 2, S31 (2010).
10. Halouzka V., Hrbac J., Jirovsky D., Riman D., Jakubec P., Bartosova Z., Masek V., Mojzes P., Vacek J.: Curr. Anal. Chem. 9, 305 (2013).
11. Hianik T., Wang J.: Electroanalysis 21, 1223 (2009).
12. Roach P., Farrar D., Perry C. C.: J. Am. Chem. Soc. 127, 8168 (2005).
13. Ostatna V., Cernocka H., Paleček E.: J. Am. Chem. Soc. 132, 9408 (2010).
14. Rusling J. F.: Acc. Chem. Res. 31, 363 (1998).
15. Fojta M., Paleček E.: Anal. Chim. Acta 342, 1 (1997).
16. Dorcak V., Bartosik M., Ostatna V., Paleček E., Heyrovsky M.: Electroanalysis 21, 662 (2009).
17. Becucci L., Guidelli R.: *An electrochemical platform for studying biomembrane processes: Mercury-supported biomimetic membranes*. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken 2014.
18. Paleček E., Tkac J., Bartosik M., Bertok T., Ostatna V., Paleček J.: Chem. Rev. 115, 2045 (2015).
19. Paleček E.: Nature 188, 656 (1960).
20. Brabec V., Dryhurst G.: J. Electroanal. Chem. 89, 161 (1978).
21. Fojta M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 715 (2004).
22. Vacek J., Havran L., Fojta M.: Electroanalysis 21, 2139 (2009).
23. Vacek J., Vrublova E., Kubala M., Janovska M., Fojta M., Simkova E., Styskala J., Skopalova J., Hrbac J., Ulrichova J.: Electroanalysis 23, 1671 (2011).
24. Fojta M., Bowater R. P., Stankova V., Havran L., Lilley D. M. J., Paleček E.: Biochemistry 37, 4853 (1998).
25. Armstrong F. A., Heering H. A., Hirst J.: Chem. Soc. Rev. 26, 169 (1997).
26. Armstrong F. A., Wilson G. S.: Electrochim. Acta 45, 2623 (2000).
27. Blanford C. F.: Chem. Commun. 49, 11130 (2013).
28. Eddowes M. J., Hill H. A. O.: J. Am. Chem. Soc. 101, 4461 (1979).
29. Heyrovsky M., Mader P., Vesela V., Fedurco M.: J. Electroanal. Chem. 369, 53 (1994).
30. Dorcak V., Paleček E.: Anal. Chem. 81, 1543 (2009).
31. Brdicka R.: Collect. Czech. Chem. Commun. 5, 112 (1933).
32. Brdicka R.: Collect. Czech. Chem. Commun. 5, 148 (1933).
33. Heyrovsky J., Babicka J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 2, 370 (1930).
34. Heyrovsky M., v: *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, str. 658. Elsevier, Amsterdam 2005.
35. Tomschik M., Havran L., Fojta M., Paleček E.: Electroanalysis 10, 403 (1998).
36. Tomschik M., Havran L., Paleček E., Heyrovsky M.: Electroanalysis 12, 274 (2000).
37. Paleček E., Heyrovský M.: Chem. Listy 111, 73 (2017).
38. Vacek J., Zatloukalova M., Havlikova M., Ulrichova J., Kubala M.: Electrochem. Commun. 27, 104 (2013).
39. Paleček E., Bartosik M., Ostatna V., Trefulka M.: Chem. Rec. 12, 27 (2012).
40. Brabec V., Mornstein V.: Biochim. Biophys. Acta 12, 159 (1980).
41. Brabec V., Mornstein V.: Biophys. Chem. 625, 43 (1980).
42. Sequaris J. M.: Compr. Anal. Chem. 27, 115 (1992).
43. Ostatna V., Cernocka H., Kurzatowska K., Paleček E.: Anal. Chim. Acta 735, 31 (2012).
44. Zatloukalova M., Vacek J., Simanek V.: Heterocycles 88, 879 (2014).
45. Seddon A. M., Curnow P., Booth P. J.: Biochim. Biophys. Acta Biomem. 1666, 105 (2004).
46. Shen H. H., Lithgow T., Martin L. L.: Int. J. Mol. Sci. 14, 1589 (2013).
47. Landau E. M., Rosenbusch J. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 14532 (1996).
48. Hernandez V. A., Scholz F.: Langmuir 22, 10723 (2006).
49. Jiang C., Davalos R. V., Bischof J. C.: IEEE Trans. Biomed. Eng. 62, 4 (2015).
50. Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H.: EMBO J. 1, 841 (1982).
51. Novakova K., Navratil T., Sestakova I., Le M. P., Vodickova H., Zamecnikova B., Sokolova R., Bulickova J., Gal M.: Monatsh. Chemie 146, 819 (2015).
52. Nováková K.: Chem. Listy 109, 166 (2015).
53. Naumann R. L. C., Nowak C., Knoll W.: Soft Matter 7, 9535 (2011).
54. Diclescu V. C., Chiorcea-Paquim A. M., Tugulea L., Vivan M., Oliveira-Brett A. M.: Bioelectrochemistry 74, 278 (2009).
55. Amatore C., Arbault S., Guille M., Lemaitre F.: Chem. Rev. 108, 2585 (2008).

56. Vacek J., Zatloukalova M., Geleticova J., Kubala M., Modriansky M., Fekete L., Masek J., Hubatka F., Turanek J.: *Anal. Chem.* **88**, 4548 (2016).
57. Nazaruk E., Landau E. M., Bilewicz R.: *Electrochim. Acta* **140**, 108 (2014).
58. Hrbac J., Halouzka V., Trnkova L., Vacek J.: *Sensors (Switzerland)* **14**, 13943 (2014).
59. Fenn J. B.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 3871 (2003).
60. Gross J. H.: *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 63 (2014).
61. Batchelor-McAuley C., Dickinson E. J. F., Rees N. V., Toghiani K. E., Compton R. G.: *Anal. Chem.* **84**, 669 (2012).
62. Bano K., Rusling J. F.: *Electroanalysis* **28**, 2636 (2016).
63. Munge B. S., Stracensky T., Gamez K., DiBiase D., Rusling J. F.: *Electroanalysis* **28**, 2644 (2016).
64. Dolci L. S., Zanarini S., Della Ciana L., Paolucci F., Roda A.: *Anal. Chem.* **81**, 6234 (2009).
65. Fan F. R. F., Bard A. J.: *Science* **267**, 871 (1995).
66. Pumera M.: *Mater. Today* **14**, 308 (2011).
67. Palecek E., Fojta M.: *Talanta* **74**, 276 (2007).
68. Branton D., Deamer D. W., Marziali A., Bayley H., Benner S. A., Butler T., Di Ventra M., Garaj S., Hibbs A., Huang X., Jovanovich S. B., Krstic P. S., Lindsay S., Ling X. S., Mastrangelo C. H., Meller A., Oliver J. S., Pershin Y. V., Ramsey J. M., Riehn R., Soni G. V., Tabard-Cossa V., Wanunu M., Wiggins M., Schloss J. A.: *Nat. Biotechnol.* **26**, 1146 (2008).
69. Kawano R., Osaki T., Sasaki H., Takinoue M., Yoshizawa S., Takeuchi S.: *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8474 (2011).
70. Binnig G., Rohrer H.: *IBM J. Res. Develop.* **44**, 279 (2000).
71. Fojta M., Havran L., Pivonkova H., Horakova P., Hocek M.: *Curr. Org. Chem.* **15**, 2936 (2011).
72. Hocek M., Fojta M.: *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5802 (2011).
73. Arnold A. R., Grodick M. A., Barton J. K.: *Cell Chem. Biol.* **23**, 183 (2016).
74. Dorcak V., Kabelac M., Kroutil O., Bednrova K., Vacek J.: *Analyst* **141**, 4554 (2016).
75. Shleev S., Bergel A., Gorton L.: *Bioelectrochemistry* **106**, 1 (2016).
76. Bard A. J., Fox M. A.: *Acc. Chem. Res.* **28**, 141 (1995).
77. Kothe T., Plumere N., Badura A., Nowaczyk M. M., Guschin D. A., Rogner M., Schuhmann W.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 14233 (2013).
78. Esteban-Fernandez De Avila B., Martin A., Soto F., Lopez-Ramirez M. A., Campuzano S., Vasquez-Machado G. M., Gao W., Zhang L., Wang J.: *ACS Nano* **9**, 6756 (2015).
79. Kabelac M., Kroutil O., Predota M., Lankas F., Sip M.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 4217 (2012).
80. Jindra J.: *Dějiny elektrochemie v českých zemích 1882–1989*. Nakladatelství Libri, Praha 2009.
81. Kalvoda R.: *Chem. Listy* **98**, 831 (2004).
82. Zuman P., Palecek E.: *Perspectives in Bioanalysis* **1**, 755 (2005).

J. Vacek^a, D. Novák^a, and M. Zatloukalová^{a,b}

(^aDepartment of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic, ^bFaculty of Chemistry, Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw, Poland): **New Directions in the Electrochemistry of Biomacromolecules: Short Overview and Discussion**

Electrochemical methods play an important role in basic physical and chemical research and are widely used for analytical purposes, today especially in the development of new sensors and in miniaturized laboratory technology, working both in a stationary and a flow-through mode. Since mid 20th century, electrochemical approaches have been applied in their full extent for biochemical and biophysical research, which led to the emergence of a new discipline called "bioelectrochemistry". This work aims to inform readers about current trends in the electrochemistry of biologically active substances; attention is given mainly on macromolecular systems. In addition to research focused on the analysis of nucleic acids and proteins, dynamic processes associated with intermolecular interactions, transporter effects and interactions of molecules with solid surfaces and membranes immobilized onto electrode surfaces are described here. The authors do not claim to provide a comprehensive overview of current knowledge. On the contrary, our work targets on selected areas of interest: the above-mentioned segments of bioelectrochemical research are discussed and critically assessed.