UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023 Barbora Soukupová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení mikroRNA pomocí elektrochemických metod

Bakalářská práce

2023 Barbora Soukupová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Barbora Soukupová**
Osobní číslo:	**C19294**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Téma práce:	**Stanovení miRNA pomocí elektrochemických metod**
Téma práce anglicky:	**Determination Of miRNA Using Electrochemical Methods**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Z dostupných literárních zdrojů vypracujte rešerši o možnostech stanovení miRNA pomocí elektrochemických metod.
V první části definujte, co jsou molekuly miRNA a zaměřte se na jejich roli jako potenciálních biomarkerů některých onemocnění. V další části popište možnosti elektrochemické detekce – biosenzory pro stanovení miRNA. Zaměřte se na používané detekční metody, uspořádání, elektrody a přípravu vzorku k analýze.
V závěru práce uveďte konkrétní příklady takových biosenzorů.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Pro vypracování rešerše využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed, ScienceDirect, Web of Science, Scopus*, apod. Jako zdroje využijte zejména odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Další dle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Denisa Smělá**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

prof. Mgr. Roman Kanďár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení miRNA pomocí elektrochemických metod, jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2023

Barbora Soukupová

PODĚKOVÁNÍ

Především bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. a konzultantce Mgr. Denise Smělé, za odborné vedení mé bakalářské práce, trpělivost, čas a hlavně ochotu, kterou mé práci věnovaly. Další poděkování patří hlavně mé rodině, která mě celou dobu při psaní práce podporovala.

ANOTACE

Práce se zabývá molekulami miRNA a možnostmi jejich stanovení pomocí elektrochemických metod. Pozornost je také věnována biogenezi, významu mikroRNA v řadě onemocnění a možnostem stanovení mikroRNA. Jsou uvedeny některé konkrétní příklady konstrukce biosenzorů pro stanovení mikroRNA.

KLÍČOVÁ SLOVA

mikroRNA, biogeneze, biomarkery, rakovina, biosenzory

TITLE

Determination of miRNA using electrochemical methods

ANNOTATION

The thesis studies miRNA molecules and the possibilities of their determination by electrochemical methods. Attention is also focused on biogenesis, the importance of microRNAs in many diseases and the possibilities of microRNA determination. Some specific examples of biosensor design for microRNA determination are given.

KEYWORDS

microRNA, biogenesis, biomarkery, cancer, biosensors

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ 8
SEZNAM TABULEK 8
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK 9
ÚVOD 12
1. Historie nukleových kyselin 13
2. Centrální dogma molekulární biologie 14
2.1. Chemická struktura nukleových kyselin 14
2.1.1. Nukleové báze 15
3. Deoxyribonukleová kyselina (DNA) 17
3.1. Struktura 17
3.2. Druhy DNA 18
3.3. Transkripce a translace 18
3.4. Replikace 20
4. Ribonukleová kyselina RNA 22
4.1. Mediátorová (messenger) RNA 22
4.2. Transferová RNA 22
4.3. Ribosomální RNA 23
4.4. Malá jaderná RNA (Small Nuclear RNA) 23
5. MikroRNA 24
5.1. Vznik mikroRNA 24
5.2. mikroRNA jako biomarkery onemocnění 25
5.3. Možnosti stanovení miRNA 27
5.3.1. Northern blotting 28
5.3.2. Microarray 28
5.3.3. Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) 30
6. Elektrochemická detekce 33
6.1. Pracovní elektrody 34
6.2. Iontově selektivní elektrody (ISE) 34
6.3. Voltametrie a polarografie 35
6.4. Amperometrické a voltametrické biosenzory 36
6.5. Diferenční pulzní voltametrie (DPV) 36
6.6. Voltametrie s polarizačním napětím obdélníkového tvaru/Square Wave Voltammetry (SWV) 36
6.7. Elektrochemiluminiscence (ECL) 37
6.8. Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) 38
7. Elektrochemické biosenzory miRNA 39
ZÁVĚR 46

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura polynukleotidového řetězce nukleové kyseliny 15
Obrázek 2: Purinové a pyrimidinové báze 15
Obrázek 3: Druhy konformací DNA 17
Obrázek 4: Centrální dogma molekulární biologie 20
Obrázek 5: Vznik mikroRNA 25
Obrázek 6: Schéma Scano-miR čipu 29
Obrázek 7: Schematické znázornění jednostupňové detekce miRNA pomocí qRT-PCR 31
Obrázek 8: Schematické znázornění procesu konstrukce DNA-biosenzoru 40
Obrázek 9: Schéma možných způsobů reakce MB ET s povrchem (A) ss-DNA/MWCNT-COOH/GCE, směrová a (B) miRNA/ DNA/MWCNT-COOH/GCE, zprostředkovaná miRNA/DNA 42
Obrázek 10: Obrázek elektrochemického biosenzoru pro detekci miRNA-155. (A) Imobilizace Anti-miRNA155 na zlatém povrchu; (B) Blokování nespecifické vazby a (C) Hybridizace s miRNA-155 .43

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Průběh DPV a SWV 37
Tabulka 2: Odezvy SWV během inkubace DNA-biosenzoru v neředěném slepém vzorku plazmy 41
Tabulka 3: Histogramy s chybovými úsečkami oxidačních signálů MB 42
Tabulka 4: Měření EIS (A) a SWV (C) a odpovídající kalibrační křivky (B a D) 44
Tabulka 5: DPV křivky sonda/MWCNTs/GC elektrody před a po hybridizaci s miRNA-24 44

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATP	adenosintrifosfát
Au-SPE	zlatá tištěná elektroda
cDNA	komplementární DNA
CD	centrální dogma
CDP	cytidin difosfát
CHA	sestava katalytických vlásenek
CPE	uhlíková pastová elektroda
CPs	snímací sondy
dsDNA	dvouvláknová DNA
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
DME	kapající rtuťová elektroda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA methyltransferáza
DPV	diferenční pulzní voltametrie
DTT	dithiotreitol
ECL	elektrochemilumuniscence
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
EZH2	histon metyltransferázová podjednotka
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
H3	trimethylace histonu
HEM	hematoxylin
HgFE	rtuťová filmová elektroda
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
ISE	iontově selektivní elektrody
LNA	uzamčená nukleová kyselina
Met-tRNA	methionin-transferová RNA

MB	methylenová modř
miRISC	ribonukleoprotein, který obsahuje navázanou mikroRNA
mRNA	mediátorová RNA
mtDNA	mitochondriální DNA
MWCNT	vícestěnné uhlíkové nanotrubičky
ncRNA	nekódující RNA
NK	nukleová kyselina
NHS	N-hydroxysukcinimid
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
nt	nukleotid
pDNA	plazmidová DNA
ptDNA	plastidová DNA
P	primer
PAn	polyanilin
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PBS	fosfátový pufr
PGE	elektrody z pyrolytického grafitu
PNA	peptidová nukleová kyselina
POC	point-of-care
rRNA	ribosomální RNA
PRC2	polykombinační represivní komplex 2
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězcová reakce v reálném čase
RNA	ribonukleová kyselina
RP	reverzní primer
ssDNA	jednovláknová DNA
snRNA	malá jaderní RNA
SNA-AuNPs	konjugáty nanočástic zlata
SPR	povrchová plasmová resonance
SWV	voltametrie s polarizačním napětím obdélníkového tvaru
tRNA	transferová RNA

TME	okolní nádorové mikroprostředí
UDP	uridindifosfát

ÚVOD

Molekuly miRNA byly objeveny v roce 1993 a ukázalo se, že hrají velmi důležitou roli při diferenciaci, proliferaci či apoptóze. Bylo prokázáno, že poruchy v expresi mikroRNA mohou vést např. k závažným poškozením imunitního systému, nebo i ke vzniku nádorových onemocnění. MikroRNA je proto v centru pozornosti vědců a její výzkum je velmi žádaný. Bylo nutno zavést spolehlivé metody pro analýzu exprese mikroRNA. V posledních letech je hlavním trendem analýzu zjednodušit, ale hlavně zrychlit.

Tato práce přináší shrnutí dosavadních poznatků o centrálním dogma, DNA, RNA a hlavně o miRNA, metodách jejich analýzy a biosenzorech.

Začátek této práce je zaměřena na historii nukleových kyselin a centrálním dogma. Poté se práce zaměřuje i na strukturu a druhy DNA a také i na transkripci, translaci a replikaci.

Další část se zabývá RNA, a hlavně druhy RNA. Poté je zaměřena na miRNA a to především na její vznik a možnosti miRNA jako biomarkeru při různých onemocněních. Také se tato část zaměřuje na různé možnosti stanovení miRNA.

V závěru tato práce pojednává o elektrochemických metodách, jejich využití u miRNA a také o některých elektrodách. Poté se zaměřuje i na využití biosenzorů, jsou uvedeny příklady biosenzorů pro detekci miRNA.

1. Historie nukleových kyselin

V Tübingenu zahájil svou výzkumnou kariéru Friedrich Miescher, který se zabýval fyziologií lidských lymfatických buněk. V roce 1868 hledal snáze dostupný materiál, začal studovat bílé krvinky obsažené v lidském hnisu. Po izolaci buněk alkoholem je inkuboval surovým přípravkem pepsinu z prasečího žaludku a získal tak šedou sraženinu čistých buněčných jader [1]. Jako první se Miescher zaměřil na typy proteinů. Proteiny považoval za nejlepší cíle pro pochopení, jak buňky vlastně fungují. Miescher dokázal, že hlavními složkami cytoplazmy byly právě proteiny (a lipidy), podrobně pak popsal jejich vlastnosti a pokusil se i o jejich klasifikování [2]. Účinkem kyseliny a alkálie vznikla Miescherovi sraženina látky obsahující fosfor, kterou pojmenoval nuklein [1]. Tato látka měla sice podobné vlastnosti jako bílkoviny, ale nebyla proteinem [2]. Později zjistil, že tento materiál je běžnou složkou kvasinek, ledvin, jater, varlat a červených krvinek. [1]. Nuklein našel i u spermií zvířat (kaprů, žab, kuřat a býků). Po smrti Mieschera, Albrecht Kossel objevil, že se nuklein skládá z dalších molekul, a to sacharidu a 4 bází [2]. V roce 1889 byl zaveden název "nukleová kyselina" [3]. V posledních letech před druhou světovou válkou L. W. Astbury a F. Bell publikovali studii o struktuře DNA [4]. Mezi lety 1940-1950 Avery, MacLeod a McCarthy experimentálně prokázali, že DNA je nositelem genetické informace. Roku 1953 představili strukturu DNA Watson s Crick, a tím i poskytli první vhled, jak DNA funguje [2]. Navázali tak na objev od Rosalindy Franklinové, která použitím rentgenové difrakční analýzy určila strukturu molekuly DNA [5].

Nukleové kyseliny mají v buňce důležitou funkci. Jsou úložištěm genetické informace odpovědné za přenos dědičných vlastností z rodičů na děti a z jedné buňky do druhé. Zajišťují syntézu buněčných proteinů a jsou zodpovědné za správné sestavení aminokyselin v definovaných sekvencích. Morfologická a funkční jedinečnost každé živé bytosti je určena informacemi obsaženými v jejích nukleových kyselinách. Obsahují uhlík, vodík, kyslík, dusík a fosfor, mají také kyselý charakter a nacházejí se ve všech živých bytostech [6]. Nukleová kyselina je schopna řídit proces syntézy bílkovin určující dědičné vlastnosti každé živoucí věci [7].

2. Centrální dogma molekulární biologie

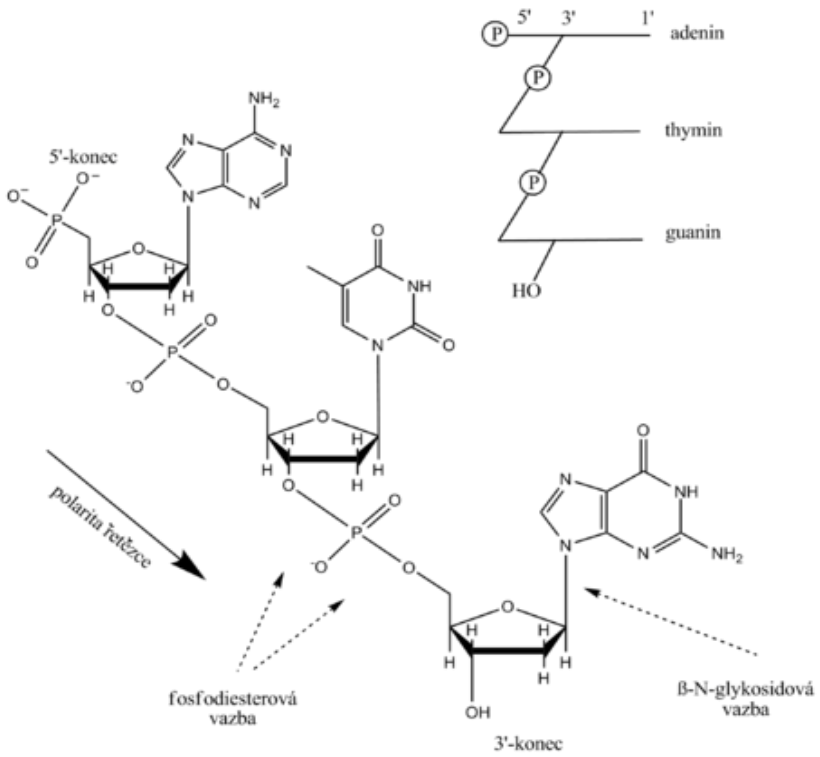
Před více jak šedesáti lety byl F. Crickem představen diagram nazvaný centrální dogma (CD) [8]. Popisuje přenos genetické informace z DNA na RNA a do proteinu. CD zahrnuje čtyři klíčové procesy, kterými jsou: replikace DNA (DNA na DNA), reverzní transkripce (RNA na DNA), transkripce (DNA na RNA) a translace (RNA na protein). V CD je tedy genetická informace přenesena z DNA přes RNA na protein. DNA je zásadní determinantou při regulaci integrity a stability genomu [9]. Rychlost čtyř klíčových procesů CD je řízena různými regulátory. Rychlost transkripce je řízena transkripčními faktory a remodelátory chromatinu. Translace je dána proteiny, které vážou RNA a nekódující RNA [10]. DNA je nukleová kyselina, která je dvouřetězcová a je nositelkou genetické informace. RNA je také nukleová kyselina, která se skládá z vlákna nukleotidů a ty jsou navzájem spojené kovalentními vazbami [11, 12]. RNA se dělí na kódující a nekódující. Kódující RNA je překládána do proteinu. Nekódující RNA (ncRNA) jsou skupinou transkriptů, které nejsou přeložené do proteinu procesu translace. Jsou děleny především na malé molekulární ncRNA a delší ncRNA [13].

2.1. Chemická struktura nukleových kyselin

Nukleové kyseliny se přirozeně vyskytují jako chemické sloučeniny, které se mohou rozkládat za vzniku kyseliny fosforečné, sacharidu a směsi organických bází, kterými jsou puriny a pyrimidiny. Nukleová kyselina je hlavní molekulou, která je schopna přenášet informace buňky a dokáže i řídit proces syntézy bílkovin určující dědičné vlastnosti každého živého organismu [14].

Každá nukleová kyselina je polynukleotidem. Jedná se o molekuly s dlouhým řetězcem, které jsou složené z řady stavebních jednotek, nukleotidů. Každý nukleotid se dále skládá z aromatické báze (nukleové báze), která obsahuje dusík připojený k cukru (pentóza) a ten je připojen k fosfátové skupině [7].

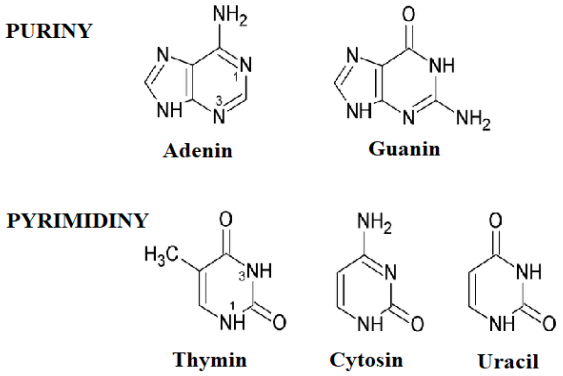
Základem každé nukleové kyseliny je pěti-uhlíkatý monosacharid: v případě ribonukleové kyseliny (RNA) je to β-D-ribóza a její deoxyderivát 2-deoxy-β-D-ribóza v případě deoxyribonukleové kyseliny (DNA). U obou typů nukleových kyselin jsou do struktury zapojeny dále zbytky kyseliny fosforečné, fosfátové skupiny, které fosfodiesterovou vazbou propojují uhlíky 3‘ a 5‘ příslušných pentóz. Střídající se fosfátové skupiny a monosacharidové jednotky tvoří pentóza-fosfátovou páteř u obou typů nukleových kyselin. Poslední složkou jsou dusíkaté báze, které jsou derivátem dvou heterocyklických sloučenin, pyrimidinu a purinu, mající slabě zásaditý charakter (viz. obr. 1) [7, 15].



Obrázek 1: Struktura polynukleotidového řetězce nukleové kyseliny. Převzato z: [16].

2.1.1. Nukleové báze

Seřazení bází je důležité, protože genetická informace je uložena v molekule DNA (RNA) právě díky správnému řazení bází. Vlákna drží pohromadě díky správnému párování bází na protilehlých vláknech, která se řídí dvěma komplementárními principy a to: velikostí a komplementaritou bazí. Díky komplementaritě se velká 9-atomová purinová báze (A=adenin, G=guanin) může párovat s malou 6-atomovou kruhovou pyrimidinovou bází (U/T=uracil/thymin a C=cytosin) [17]. DNA se skládá z adeninu, guaninu, thyminu a cytosinu [18]. RNA obsahuje báze adenin, guanin, uracil a cytosin (viz. obr. 2) [1].



Obrázek 2: Purinové a pyrimidinové báze. Převzato a upraveno z: [19].

Za nejvíce se vyskytující ribonukleotid v těle je považován adenosin 5'-trifosfát (ATP). Je univerzálním nosičem energie v živém organismu. Nukleotidy jsou také prekurzory některých koenzymů, používají se i v reakcích, kde dochází např. k přeměně živin na energii. Adenosin a guanosin jsou nukleosidy, které v buňkách mají funkci přenosu vnějších signálů na buněčnou odpověď a také se podílejí na syntéze proteinů. V nízkých buněčných koncentracích jsou zastoupeny pyrimidinové nukleotidy, které ale také mohou plnit různé funkce. Uridin difosfát (UDP)-glukóza a cytidin difosfát (CDP)-lipid, jsou aktivními meziprodukty syntézy glykogenu a membrán [20, 21, 22].

Oligonukleotidy jsou krátké, jedno-vláknové nebo dvou-vláknové DNA nebo RNA molekuly, které zahrnují i antisense oligonukleotidy, interferentní RNA a aptamer RNA. Oligonukleotidy RNAi jsou určeny hlavně pro regulaci genové a proteinové exprese [23]. Oligonukleotidy se syntetizují přidáním jedné báze na druhou, rozšiřují se od 5' k 3' konci řetězce [24].

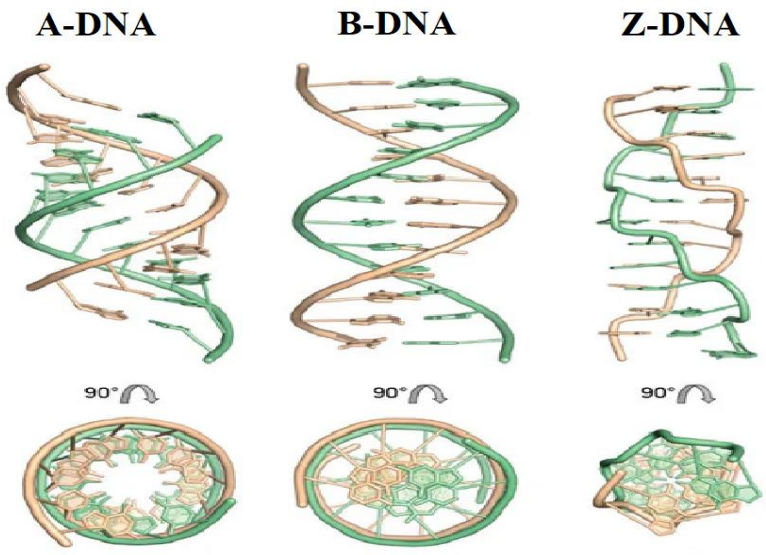
3. Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

Deoxyribonukleová kyselina je nositel genetické informace a je to také základní materiál biologické dědičnosti. Díky sekvencím nukleových kyselin, které se liší v každém živém organismu, patogenu či viru, dokážeme rozpoznat a určit různé druhy nemocí [25]. DNA dokáže uchovat informace pro syntézu proteinů [26].

3.1. Struktura

Struktura DNA poskytuje ochranu atomům bází před chemickou modifikací [28]. DNA je pravotočivá dvoušroubovice neboli dvojitá šroubovice [12]. Ve středu dvojité šroubovice se nachází jednotlivé báze. Fosfátová základna neboli páteř nukleových kyselin se nachází na vnější straně šroubovice. Pro různé procesy, jako je replikace, transkripce, se deoxyribonukleová kyselina musí uvolnit, aby mohla poskytnout přístup ke genetickým informacím, které jsou uložené ve středu dvojité šroubovice [28].

Hlavní konformace dvojité šroubovice deoxyribonukleové kyseliny je B-forma. Dále máme konformace odlišné od B-formy a to: pravotočivou A-formu DNA, která vzniká z B-formy v prostředí nízké aktivity vody [29]. Monokrystalická rentgenová struktura fragmentu deoxyribonukleové kyseliny, čímž byl samokomplementární hexamer DNA $d(CG)_3$, ukázala, že existuje i levotočivá dvojitá šroubovice Z-DNA, která má dva antiparalelní řetězce tvořené bázemi (viz. obr. 3) [30].



Obrázek 3: Druhy konformací DNA. Převzato a upraveno z: [31].

3.2. Druhy DNA

Mitochondriální (mtDNA) je savčí kruhovou dvouvláknovou molekulou, která kóduje 13 proteinů, z nichž jsou všechny podjednotky dýchacího řetězce, kóduje i 24 složek RNA (22 tRNA a 2 rRNA), které jsou nezbytné pro syntézu mitochondriálních proteinů. Savčí mitochondrie dle odhadu obsahují přibližně 1500 různých proteinů, z toho vyplývá, že většina mitochondriálních proteinů je kódováno geny jaderné DNA [32].

U plazmidové DNA (pDNA) jsou plazmidy dvouvláknové molekuly DNA kovalentně uzavřené. Ty, co jsou určené k terapeutické aplikaci obsahují lidské nebo nelidské geny a ve srovnání s proteiny jsou velmi velké. Plazmidy jsou extrachromozomální, autonomně se replikující molekuly DNA [33]. Osa, kterou tvoří šroubovice pDNA může být stočena i v prostoru a vytvořit tak molekulu vyššího řádu, která se nazývá supercoiled pDNA [34].

Další druh DNA je Plastidová DNA. Plastidy, také nazývané jako chloroplasty, jsou eukaryotické organely v typickém případě sloužící při fotosyntéze [35]. Plastidy se podílejí na buněčném a energetickém metabolismu, na skladování a reprodukci. Plastidová genetická technika je organizována prokaryotickým způsobem. Existence DNA v množství organel, které jsou definované jako plastidy, je pravděpodobně univerzální. DNA byla cytologicky prokázána ve všech hlavních rostlinných kmenech, stejně jako ve většině vývojových modifikacích organely. Důkazy jsou k dispozici z experimentů Oenothera a ty naznačují, že plastidová DNA (ptDNA) je ontogeneticky odlišná a je přenášená nezávisle na jaderné DNA [36].

3.3. Transkripce a translace

Všechny živé organismy obsahují systém replikace svého genomu. Pomocí DNA polymerázy, která je přeložena z mRNA je genomová DNA replikována. Organismy mohou přenést svou genetickou informaci na své potomky díky transkripci a translaci [37].

Transkripce je postup, při kterém je genetický kód přepsán z DNA do molekuly mediátorové RNA (mRNA) [38]. Transkripce probíhá v jádře a je zahájena vazbou RNA-polymerázy a speciálních proteinů, které se označují jako transkripční faktory, k tzv. promotoru [39]. Promotor zahajuje transkripci, při které se RNA polymeráza a faktor transkripce verbují do promotoru, RNA polymeráza se zaktivuje a tím se rozvine dvoušroubovice DNA [38]. Tímto vznikne iniciační komplex, jehož součástí je i templátové vlákno DNA (konkrétně je to promotorová oblast přepisovaného genu), enzym RNA-polymeráza a transkripční faktory [39].

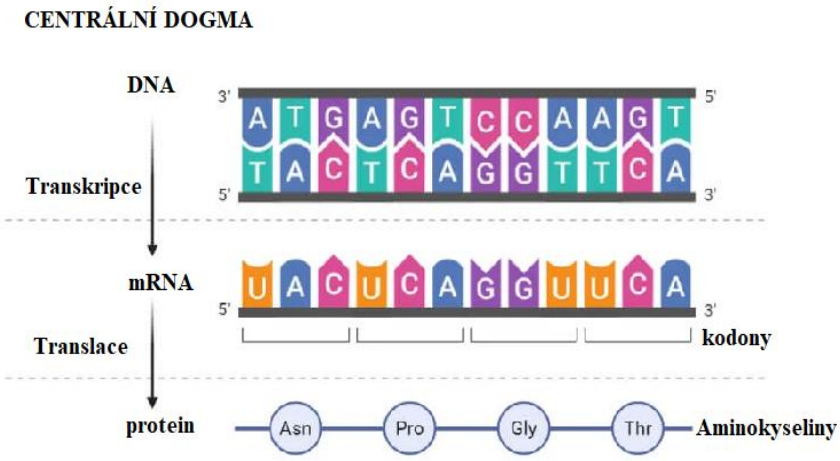
Poté se postupně připojí báze na základě komplementarity, přičemž mezi molekulami templátové DNA a nově syntetizované RNA dochází k vytváření párů adenin-uracil a guanin-cytosin. Připojování probíhá až do okamžiku, kdy dojde k dosažení specifické sekvence, která je známkou ukončení celého procesu (stop kodon: UAA, UAG a UGA). Dojde tak k oddělení RNA-polymerasy od vlákna DNA. Výsledkem transkripce je molekula RNA, která musí ještě projít specifickými úpravami, např. sestřihem a teprve poté může plnit svoji funkci v cytosolu buňky [39].

Translace, nebo-li překlad, je velmi důležitým procesem života. Zodpovídají za ni ribozomy, které čtou zprávu zakódovanou v mediátorové RNA (mRNA) [26]. Při syntéze proteinů je tedy informace uložená v mRNA a překládána do sekvence aminokyselin v odpovídajícím polypetidovém řetězci. Aminokyseliny, které jsou volné musí být nejprve aktivovány reakcí s ATP a teprve poté mohou být přeneseny na 3‘-konec odpovídající transferové RNA (tRNA) za tvorby aminoacyl-tRNA [39].

Proces translace je tvořen ve třech stupních: iniciace, elongace a terminace. Zahájení iniciace má na starost vytvoření komplexu mezi menší ribosomální podjednotkou a iniciačním aminoacylem-tRNA, který nese první aminokyselinu. U eukaryotů je tato aminokyselina methionin a vzniká Met-tRNA. Ke komplexu se dále připojí guanosintrifosfát (GTP) a specifické bílkoviny, které se označují jako iniciační faktory, také se připojuje mRNA a velká ribosomální podjednotka [39]. Velká ribozomální podjednotka má tři místa, na které se mohou vázat molekuly tRNA a aminokyselinové místo, kde se aminoacyl-tRNA antikodonová báze páruje s kodonem mRNA. To zajistí, že se správná aminokyselina přidá do rostoucího polypeptidového řetězce. V polypeptidovém místě je aminokyselina přenesena z její tRNA do rostoucího polypeptidového řetězce. Místo výstupu je u transferové RNA, než se uvolní do cytoplazmy, aby mohla navázat další aminokyselinu a mohla tak opakovat proces [27].

Elongace nebo-li prodlužování je proces, který začíná dodáním příbuzné elongační transferové RNA do aminokyselinového místa (A) ribozomu [17]. Když se komplex aminokyselin transferové RNA naváže do místa A, tak se guanosintrifosfát (GTP) štěpí na guanosidifosfát (GDP) a poté se uvolní. Po vytvoření peptidové vazby mezi sousedící první a druhou aminokyselinou, dojde k dalšímu posunutí nebo translokaci ribozomu. To způsobí obsazení E místa tRNA, která je pak uvolněna do cytoplazmy, kde vyzvedne následující aminokyselinu. Tento proces se opakuje, dokud nedojde k přečtení všech kodonů v mRNA molekulami tRNA

a dokud aminokyseliny připojené k tRNA nejsou spojeny dohromady v rostoucím řetězci ve vhodném pořadí [40]. (Viz. obr. 4)



Obrázek 4: Centrální dogma molekulární biologie. Převzato a upraveno z: [41].

3.4. Replikace

U replikace dochází k syntéze DNA, jejím výsledkem je vznik dvou identických dvouřetězcových molekul DNA. Tímto stylem se zajistí uchování a předání genetické informace [39].

Nejprve se segment DNA z vysoce organizovaných nukleozomů uvolní z histonů a dalších proteinů, které zhustí jeho strukturu. Dvojitá šroubovice DNA se poté odvine, obě vlákna se oddělí a jsou zpřístupněna pro nové párování bází. Nové nukleotidy jsou spojeny kovalentní vazbou a sekvence rostoucího řetězce se provádí komplementárním párováním bází s vláknem šablony. Histony se poté přidávají zpět do obou duplexů s příslušnými modifikacemi pro zachování epigenetických signálů [42].

K zahájení replikace dochází v iniciačních místech chromozomů, kde dochází k uvolnění a rozvinutí dvoušroubovice DNA a k vytvoření replikačních bublin. Každé rozvinuté vlákno DNA je předlohou, nebo-li templátem, pro syntézu nového vlákna DNA. Zodpovědnost za postupné připojování nukleotidů na principu komplementarity bází má DNA-polymeráza. Zahájení účinku DNA-polymerázy je nezbytný tzv. primer, tj. krátký řetězec RNA, který je v replikační bublině komplementární k určité části DNA. Prodlužování syntetizovaného vlákna lze provést pouze ve směru 5' → 3', ke kontinuální syntéze dochází jen u jednoho z řetězců (vedoucí řetězec). U druhého, který nese označení jako opožďující se řetězec, se replikace uskutečňuje po částech (Okazakiho fragment), které jsou poté následně navzájem spojeny do

souvislého vlákna. Replikace je ukončena, jsou-li vytvořena obě kompletní nová vlákna DNA [39].

4. Ribonukleová kyselina RNA

Struktury DNA a RNA jsou přizpůsobeny své roli informačních molekul [43]. Ačkoli RNA a DNA jsou tvořeny podobnými stavebními jednotkami, výsledné molekuly jsou zcela odlišné. Pokud jde o složitost a rozmanitost jejich trojrozměrných struktur, RNA jsou mnohem více podobné proteinům než DNA [44].

Vyskytují se 3 nejznámější typy RNA: tRNA, rRNA a mRNA. Tyto typy se od sebe liší primární a sekundární strukturou, funkcí i velikostí. Vesměs jde o jednovláknové řetězce. Přesto některé RNA (rRNA, tRNA) vykazují komplementární vazby mezi bázemi, ale pouze v rámci jednoho řetězce a jen v jistých úsecích. Na místě, kde se uplatňuje komplementarita, se jedná také o vodíkové můstky mezi cytosinem a guaninem (stejné jako v DNA), ale s adeninem se místo thyminu páruje také dvěma vodíkovými můstky uracil. Poměr mezi purinovými a pyrimidinovými bázemi je rozmanitý, nerovná se jedné jako u DNA, to platí pro všechny typy RNA. Společné pro většinu RNA je také to, že se podílejí na syntéze bílkovin [45].

4.1. Mediátorová (messenger) RNA

Mediátorová RNA (mRNA), informační, messengerová (messenger = posel), je upraveným otiskem určitého úseku DNA (strukturního genu) a je přenašečem informací z jádra k ribosomu [45]. Ve srovnání s jinými RNA jsou mediátorové RNA největšími molekulami, jejich biologický poločas se pohybuje v rozpětí desítek minut až hodin [39].

Ze všech typů RNA jsou nejméně hojné právě mRNA. Ve většině buněk nevytváří více než 5% až 10 % celkové buněčné RNA. Mediátorová RNA se tvoří, když je potřeba, řídí syntézu proteinů a poté je degradována tak, aby nukleotidy mohly být recyklovány [46].

Mediátorová RNA je uplatněna v cytosolu jako matrice při syntéze proteinů. Pro každý protein, který je tvořen buňkou, existuje specifická mRNA. V nukleotidové sekvenci mRNA je zakódováno pořadí aminokyselin daného proteinu. Každá z 20 kódovaných aminokyselin je ve struktuře mRNA vyjádřená trojicí (tripletem) po sobě jdoucích bází, označovanou jako kodon [39].

4.2. Transferová RNA

Transferová RNA molekula (tRNA) umožňuje čtení genetického kódu. Funguje na způsob molekulárního adaptéru, který spojuje mediátorový RNA kodon se specifickou aminokyselinou

[44]. Jsou skupinou podobných molekul, které přenášejí aktivované aminokyseliny k ribozomům a umožňují tak pochod translace. Molekuly transferové RNA jsou malé [45].

Aminokyseliny mohou být rozpoznány více než jednou tRNA, z důvodu existence podobných kodonů. Předpokládá se, že ve skutečnosti je v eukaryotických buňkách až 100 různých transferových RNA [44].

4.3. Ribosomální RNA

Molekuly ribosomální RNA (rRNA) mají tendenci být poměrně velké, na rozdíl od transferové RNA, v buňce existuje jen několik typů ribosomální RNA. Vzhledem k blízkému spojení mezi ribosomální RNA a proteinů, je užitečným přístupem k pochopení struktury ribosomální RNA zkoumáním samotných ribozomů [46].

Ribosomální RNA se vyskytují v několika typech, které se odlišují velikostí (100-500 nukleotidů) i složením bází a charakterizují se pomocí specifické sedimentační konstanty (S). Představují až 80 % všech RNA přítomných v buňce. Ribosomální RNA jsou strukturní součást podjednotek ribosomů, na nichž probíhá syntéza proteinů [39]. Je také velmi složitá a její modifikované báze a rozsáhlé sítě bází RNA přispívají k funkční univerzálnosti [44].

Ribozomy jsou ribonukleoproteinové částice univerzálně konzervované, které umožňují dekódování genetické informace přenášené v mRNA do aminokyselinových řetězců, proteinů [47]. Ribozomy jsou hlavně místem syntézy bílkovin a skládají se ze dvou podjednotek (velké a malé). Počet, složení a velikost ribosomů závisí na druhu a funkci buněk. Eukaryotní ribozomy mají sedimentační konstantu 80S a jejich podjednotky 60S a 40S [45].

4.4. Malá jaderná RNA (Small Nuclear RNA)

Malá jaderná RNA (snRNA) se nachází, z názvu, v jádru eukaryotických buněk. Tento typ RNA je dlouhý asi 100 až 200 nukleotidů, ale není molekulou tRNA ani malou podjednotkou rRNA. Malá jaderná RNA je v buňce komplexována s proteiny, které tvoří malé jaderné ribonukleoproteinové částice, obvykle zkráceně snRNP. Mají funkci pomoct se zpracováním počáteční mRNA přepsané z DNA do zralé formy, která je připravena k exportu z jádra [46].

5. MikroRNA

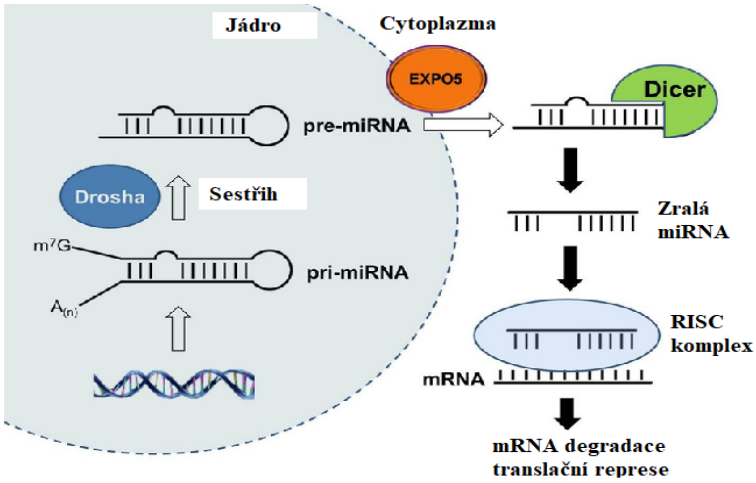
Viktor Ambros současně s Gary Ruvkunem v roce 1993 poprvé objevili mikroRNA u *Caenorhabditis elegans* a nyní jsou známy už u živočichů, rostlin, a i některých virů [48]. MikroRNA (miR, miRNA) jsou malé nekódující RNA působící jako post-transkripční regulátory genové exprese. Hrají důležitou roli téměř ve všech biologických drahách, včetně vývoje, diferenciace, buněčného cyklu, proliferace a apoptózy [49].

MikroRNA jsou krátké molekuly RNA o velikosti 19 až 25 nukleotidů. Jedna mikroRNA může cílit na stovky mRNA, a tím ovlivňovat expresi mnoha genů. Bylo prokázáno, že mikroRNA se podílí na patogenezi např. u alergických onemocnění [50]. MikroRNA jsou považovány za negativní regulátory genové exprese, které dokáží inhibovat translaci. Také podporují degeneraci messenger RNA párováním bází s komplementárními sekvencemi v 3'-nepřekládané oblasti transkriptů messenger RNA, které obsahují proteiny [51]. Hrají také velkou roli jako biomarkery onemocnění a mohou být i terapeutickými cíli u některých chorob [52].

U lidí bylo objeveno více než 2500 mikroRNA a mnoho z nich je zachováno i u jiných druhů živočichů. MikroRNA se účastní téměř všech základních buněčných funkcí, včetně vývoje, nemocí a stárnutí. V posledních letech došlo k velkému nárůstu znalostí biogeneze mikroRNA. Terapie a markery založené na RNA mají klinický význam [53].

5.1. Vznik mikroRNA

Vznik mikroRNA je zpočátku v jádře jako primární transkript (pre-miRNA) RNA polymerázy II [54]. Tyto transkripty mají schopnost tvořit vlásenkové smyčky, které jsou rozpoznány enzymem Drosha [55]. Endoribonukleolytické enzymy jsou zodpovědné za sestřih miRNA při její biogenezi. Po sestřihu se uvolní ~70 nt pre-miRNA. Ta se pomocí Exportinu-5 v komplexu s Ran-GTP přemístí do cytoplazmy, kde je upravena druhou endoribonukleolytickou reakcí, jejímž katalyzátorem je Dicer a získá se ~22 nt RNA duplex, kterému vystupují 3` převisy na obou koncích. Duplex se poté účastní reakce s proteinem a vnesení zralé miRNA do miRISC (miRISC- mikroRNA induced silencing complex), zbytek vlákna se uvolní a je degradováno (viz. obr. 5) [56].



Obrázek 5: Vznik mikroRNA. Převzato a upraveno z: [57].

5.2. mikroRNA jako biomarkery onemocnění

Rakovina je jednou z hlavních příčin úmrtí na celém světě. Vědci v posledních třech desetiletích identifikovali nové cílové molekuly specifické pro rakovinu. Ty umožnily vyvinout cílenou protinádorovou terapii s významným snížením vedlejších účinků. Molekuly miRNA dokážou ovlivnit signální transdukční dráhy pro přežití a proliferaci rakovinných buněk. MikroRNA hrají roli jako modifikátory transkripce a translace klíčových regulačních proteinů, podílejí se na vývoji a progresi rakoviny [58].

U více druhů rakoviny byla zjištěna dysregulovaná mikroRNA, kde působí jako onkogeny i nádorové supresory. První souvislost mezi dysregulací mikroRNA a rakovinou byla popsána Calinem a kol. (2002) studiem chromozomu 13q14 [49]. MikroRNA, které souvisejí s lidským onemocněním na 13q14 chromozomu jsou: miR-15a a miR-16-1 [59].

Za normálních fyziologických podmínek fungují mikroRNA tak, že chrání klíčové biologické procesy včetně buněčné proliferace, diferenciace a apoptózy. Dysregulace jedné nebo malé podskupiny mikroRNA má vliv na expresi několika stovek messenger RNA, které pohání buňky k transformaci [59]. Chybná exprese miRNA může narušit řadu buněčných signálních drah a výrazně tak ovlivnit vznik a vývoj rakoviny [49].

MikroRNA se podílí na komunikaci mezi nádorovými buňkami a okolním nádorovým mikroprostředím (TME). Interakce mezi složkami okolního nádorového mikroprostředí a nádorovými buňkami může přímo ovlivnit všechny aspekty biologie rakoviny [58].

Dysregulaci mikroRNA způsobují různé mechanismy. Jeden z nich popsali Nawaz a kol. (2017), kteří zjistili, že mikroRNA-4484 je down regulovaný tumor supresor u glioblastomu. Nachází se na křehkém lokusu u chromozomu 10, který prochází somatickými změnami v počtu kopií prostřednictvím odstranění sekvence mikroRNA [58].

MikroRNA jsou také důležitými ukazateli lékové rezistence, protože exprese mikroRNA v chemorezistentních rakovinných buňkách se často liší od exprese v jejich rodičovských chemosenzitivních buňkách. Nedávné studie zjistily vyskytující se odlišnou expresi cirkulující mikroRNA v séru pacientů s rakovinou, což je objev, který otevřel nové pole v prevenci rakoviny a včasné detekci [49]. Přítomnost určitého typu cirkulujících mikroRNA silně koreluje s projevem, invazí a metastázami rakoviny, což značí, že cirkulující mikroRNA mohou sloužit jako třída nových biomarkerů pro včasnou detekci a prognózu rakoviny [60].

Yin Yang 1 (YY1) je transkripční faktor, který hraje klíčovou roli v různých biologických procesech, včetně buněčné proliferace, diferenciace a vývoje [61]. Zhang a kol. (2013) naznačili, že miR-7 potlačuje tumorgenezi kolorektálního karcinomu tím, že se zaměřuje přímo na onkogenní gen Yin Yang 1. Prokázalo se, že exprese Yin Yang 1 je spojena se špatným přežitím u pacientů s kolorektálním karcinomem [62].

Úloha miR-25 na rakovinu může být onkogenní nebo nádor supresivní u různých druhů rakoviny, např. u adenokarcinomu plic [63] či rakoviny žaludku [64]. MiR-25 inhibuje proliferaci buněk karcinomu štítné žlázy tím, že cílí na EZH2 [62]. EZH2, histonová methyltransferázová podjednotka polykombového represorového komplexu, je opakovaně mutována v několika formách rakoviny [65]. EZH2 funguje jako podjednotka v rámci polykombinačního represivního komplexu 2 (PRC2). EZH2 reguluje trimethylaci histonu (H3) při lysinu 27 (H3K27me3). EZH2 je hlavní regulátor epigenetických modifikací [62].

Dysregulace miR-26a se zapojuje do různých biologických procesů, včetně proliferace, migrace, invaze, angiogeneze a metabolismu, prostřednictvím cílení na více mRNA. Bylo také zjištěno, že snížená exprese miR-26a může způsobit rezistenci k cisplatině a u lidí podporovat růst a migraci rakoviny plic. EZH2 je cílem miR-26 [66]. Bylo prokázáno, že miR-26a má potlačující roli u různých typů rakoviny, jako je renální karcinom [67] rakovina prostaty [69]. MiR-26a vykazuje nádorové supresivní účinky u nasofaryngeálního karcinomu, tím že potlačí EZH2 [62].

Bylo prokázáno, že rodina miR-29 hraje klíčovou roli v regulaci virové replikace. Rodinu miR-29 tvoří čtyři blízké miRNA, miR-29a, miR-29b-1, miR-29b-2 a miR-29c [68]. Cílí na DNA

methyltransferázu 3A (DNMT3A) a DNA methyltransferázu 3B (DNMT3B) přímo v karcinomu plic a glioblastomu a nepřímo cílí na DNA methyltransferázu 1 (DNMT1) u akutní myeloidní leukémie [62].

MiR-3Od-5p funguje jako nádorový supresor u nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC=Non-Small Lung Cancer) [70] a karcinomu štítné žlázy [62]. Navíc ektopická exprese miR-30d potlačuje proliferaci buněk karcinomu štítné žlázy regulací EZH2 [62].

U rakoviny žaludku byla identifikována skupina mRNA cílená na miR-34, která je potenciálním následným mediátorem účinku exosomální miR-34 u rakoviny žaludku [71]. Právě okogenní gen Yin Yang 1 se přímo zaměřuje na rodinu miR-34 (miR-34a, miR-34b a miR-34c) u rakoviny žaludku [62].

Studie uvádějí, že miR-101 je snížena u různých typů rakoviny a potlačuje progresi rakovinných buněk, jako je rakovina močového měchýře [72], rakovina prsu [73], rakovina žaludku a rakovina plic [62]. Při genomové ztrátě miR-101 u rakoviny dojde k nadměrné expresi EZH2, což vede k progresi rakoviny [62].

MikroRNA-138 působí jako nádorový supresor u nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu žlučníku a osteosarkomu. Prokázalo se, že mikroRNA-138 má funkci potlačující nádor tak, že se zaměřuje na EZH2 a zvyšuje apoptózu indukovanou cisplatinou u osteosarkomu [62].

Ukázalo se, že mikroRNA-185 (miR-185) hraje kritickou roli v tumorgenezi a progresi nádoru u lidských nádorů, jako je melanom, kolorektální karcinom, rakovina vaječníků [74]. Zhang a další oznámili, že mikroRNA-185 je down regulován v gliomových buňkách a cílí na DNA methyltransferázu 1. U gliomu mikroRNA-185 lokus na chromozomu 22q11.2 vykazuje ztrátu heterozygotnosti a ektopická exprese mikroRNA-185 inhibuje globální methylaci DNA a indukuje expresi promotorových hypermethylovaných genů [62].

5.3. Možnosti stanovení miRNA

Detekce miRNA je důležitá pro základní výzkum v biologii a pro molekulární diagnostiku a léčbu nemocí. Jedinečné vlastnosti miRNA, jako je malá velikost, nízký obsah v tkáních a buňkách a podobné sekvence, zejména členů rodiny miRNA, představují výzvu pro metody detekce. V posledních letech se zvyšujícím se rozvojem výzkumu miRNA bylo vyvinuto více metod pro detekci miRNA, lišících se z hlediska citlivosti, multiplicity, specificity, zobrazování in situ atd [75].

Většina metod detekce miRNA, jako je kvantitativní polymerázová řetězcová reakce v reálném čase (qRT-PCR) nebo northern blotting a microarray, umožňují detekci miRNA v roztocích nebo buněčných lyzátech [76]. I když tyto metody ukázaly velkou využitelnost pro detekci miRNA, tak stále existují určité slabiny. Northern blotting vyžaduje velké množství detekčního vzorku a je časově náročný. Tato metoda nemůže kvantitativně detegovat miRNA s vysokou citlivostí a specificitou. Microarray má navíc nízkou rozlišovací schopnost prekurzoru miRNA a zralého miRNA. Pro qRT-PCR je reverzní transkripce z miRNA do cDNA poměrně obtížná kvůli malé velikosti miRNA, která vyžaduje návrh sofistikovaných sekvencí [77].

5.3.1. Northern blotting

Northern blotting byl považován za zlatý standard mezi dobře zavedenými analytickými technikami. Ty byly tradičně používány pro detekci konkrétní skupiny RNA z celé skupiny RNA pomocí frakcionace dle velikosti [78].

Jedná se o semikvantitativní techniku, která může být použita k vyhodnocení genové exprese v různých časech, mezi různými tkáněmi nebo napříč druhy. Nejenže pomáhá určovat velikost transkriptu, ale zároveň identifikuje jeho alternativně sestřihané varianty [78]. Northern blotting však obecně vyžaduje separaci pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE), přenosem z gelu na membránu a detekci pomocí oligonukleotidových sond značených např. radioaktivním značením s několika promývacími kroky [75].

Složité postupy a nízká citlivost omezují jeho široké uplatnění. Byly proto vyvinuty různé přístupy ke zlepšení detekce miRNA založené na northern blotu. Pro zvýšení citlivosti a specificity analýzy byly využity oligonukleotidové sondy modifikované uzamčenou nukleovou kyselinou (LNA) a zesíťování miRNA, zprostředkované 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbidimidem [75]. Válóczi a kol. (2004) ve své studii prokázali, že detekce miRNA sondami modifikovanými LNA v northern blotech byla asi 10krát citlivější než detekce sond DNA [79].

Northern blotting má slibnější přístup pro studii malých RNA. Zobrazuje distribuci velikosti miRNA prekurzorů a zralých forem, v rozmezí od ~1000 nukleotidů (nt) pro pri-miRNA, 120-160 nt pro pre-miRNA a 20-25 nt pro zralé miRNA [78].

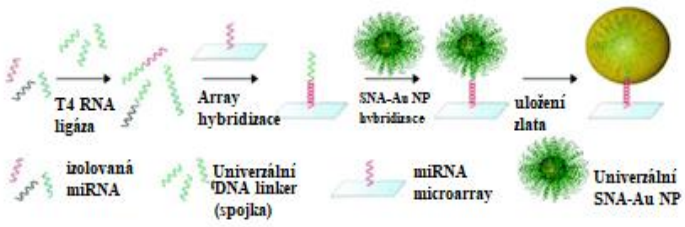
5.3.2. Microarray

MiRNA microarray je hlavní technika pro realizaci analýzy profilování miRNA. Microarray analýza se obvykle provádí fixací známé sekvence DNA sond s vysokou hustotou na pevný povrch jako je skleněná nebo nylonová membrána. Následuje interakce s různými cílovými

molekulami miRNA na základě hybridizace nukleových kyselin mezi cílovými miRNA a jejich odpovídajícími komplementárními sondami s detekcí intenzity signálu hybridizačních sond [75].

Microarray mohou detekovat jednonukleotidové polymorfismy, mapovat exonové spoje a detekovat fúzní geny, ale pouze s čipy navrženými pro tyto účely [80]. Microarray může realizovat analýzu více miRNA současně. Náklady na výrobu a detekci jsou však vysoké. Selektivita metody microarray může být nízká kvůli vysoké podobnosti sekvencí a krátké sekvenci miRNA. Je proto velmi důležité, aby analýza miRNA microarray využívala citlivou a specifickou detekční metodu, jako je fluorescenční, chemiluminiscenční, elektrochemická detekce [75].

Alhasan a kol. (2012) vyvinuli čip Scanometric MicroRNA (Scano-miR) za pomoci konjugátů sférické nukleové kyseliny (SNA) a zlatých nanočástic, jak je znázorněno na obrázku 6.



Obrázek 6: Schéma Scano-miR čipu. Převzato a upraveno z: [75].

Test využívá univerzální sondu pro enzymatickou vazbu izolovaných miRNA s následnou hybridizací na miRNA microarray. Po odmytí nenavázaných druhů miRNA byly následně hybridizovány univerzální konjugáty nanočástic zlata (SNA-AuNPs), které slouží k detekci zachycené miRNA. Dále byla intenzita signálu rozptýleného světla zesílena nanesením zlata.

Díky amplifikačnímu protokolu s rozptylem světla a vysokou specifičností a reprodukovatelností dokázal systém Scano-miR detekovat miRNA s nízkou hodnotou již od 30fM. To znamená, že ve srovnání s detekčními systémy založenými na molekulárních fluoroforech poskytuje vyšší citlivost pro cílové miRNA. Uplatnění platformy Scano-miR ve formátech čipů s vysokou hustotou demonstrovalo její užitečnost pro vysoce výkonné a multiplexované profilování miRNA z různých biologických vzorků [75].

5.3.3. Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je populární technikou molekulární biologie pro enzymatickou replikaci DNA bez použití živého organismu [81]. Příchod PCR radikálně změnil biologickou vědu od doby, kdy byla poprvé objevena. Umožnila specifickou detekci a produkci velkého množství DNA [82]. Tato technika poskytuje mnohonásobné zesílení malého množství molekuly DNA exponenciálním způsobem. Tuto techniku vyvinul v roce 1983 Dr. Kary Mullis. [81]. Je velice citlivá a může vytvářet miliony až miliardy kopií určitého produktu pro klonování, sekvenování genů a analýzu [82].

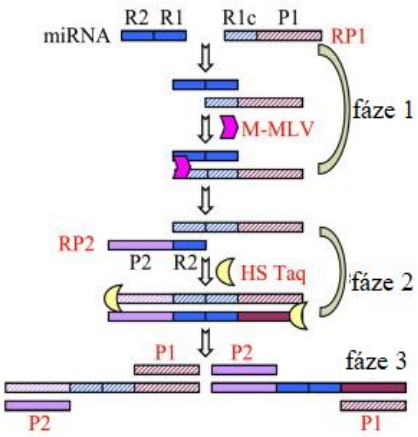
PCR je jednoduchý, ale elegantní enzymatický test umožňující amplifikaci specifického fragmentu DNA z komplexní skupiny DNA. PCR je prováděna pomocí DNA z různých organismů a tkání, včetně periferní krve, kůže, vlasů, slin a mikrobů. PCR využívá pouze stopové množství DNA, aby se vygeneroval dostatek kopií, které by mohly být analyzovány konvenčními laboratorními metodami. Díky tomu je PCR citlivým testem [82].

Každý test PCR vyžaduje přítomnost šablony DNA, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy. DNA polymeráza je klíčovým enzymem spojujícím jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku produktu PCR. Přesný produkt DNA, který má být amplifikován, určují primery v reakci. Primery jsou krátké fragmenty DNA, které obsahují definovanou sekvenci komplementární k cílové DNA, která má být detekována a amplifikována. Všechny uvedené složky jsou poté smíchány ve zkumavce nebo 96jamkové destičce a umístěny do stroje neboli termocykleru. Proces PCR se skládá ze série dvaceti až třiceti pěti cyklů a každý ještě ze tří fází [82].

Yan a kol. (2013) detekovali pomocí qRT-PCR miRNA let-7a. Výsledky vykazovaly široký lineární rozsah od 0,1 amol do 10 fmol s detekčním limitem 12,6 zmol pro miRNA let-7a [83].

Pro celý postup detekce jsou nutné čtyři primery: RP1 (reverse primer/reverzní primer), RP2, P1 a P2. RP1 obsahuje P1 a 11bázovou sekvenci R1c, která je shodná s 3‘- koncem cílové miRNA. RP2 obsahuje P2 a 11bázovou sekvenci R2, která je identická s 5‘-koncem cílové miRNA. Termocykler zahrnuje celkem tři fáze: Fáze jedna je proces reverzní transkripce. V této fázi dochází k hybridizaci části R1c RP1 s cílovou miRNA a poté k jejímu prodloužení za přítomnosti reverzní transkriptázy M-MLV (RNázy H-) a dNTP (deoxyribonukleosidtrifosfát). Kvůli teplotě tání 11bázové sekvenvce, která se blíží k 37°C, probíhá tato fáze při teplotě 37°C. Ve druhé fázi se po denaturaci při 95°C část R2 RP2 hybridizuje s cDNA miRNA při 37°C a poté se obě sekvence prodlouží za přítomnosti polymerázy Taq s tzv. hot-startem (HS-Taq) a dNTP při 60°C. Fáze tři je klasický proces PCR

s primery P1 a P2 (viz. obr. 7). Amplifikace cDNA se sleduje v systému PCR v reálném čase pomocí SYBR green I. Byla využita miRNA let-7a ve vzorcích RNA extrahovaných z nádorových buněk a metodou qRT-PCR byla úspěšně detegována [83].



Obrázek 7: Schematické znázornění jednostupňové detekce miRNA pomocí qRT-PCR. Převzato a upraveno z: [83].

Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) udává informace nad rámec pouhé detekce DNA [82]. RT-PCR je metoda, která se používá k izolaci, amplifikaci a identifikaci známé sekvence z knihovny RNA buněk nebo tkání. Je to v podstatě normální PCR, které ale předchází transkripce reverzní transkriptázou (pro konverzi RNA na cDNA). Je široce používána při mapování exprese a určování, kdy a kde jsou určité geny exprimovány [81]. qRT-PCR znázorňuje, jaké množství specifické DNA nebo genu je přítomno ve vzorku [82]. qRT-PCR je nejčastěji používanou technologií díky své vysoké citlivosti, praktičnosti a přesnosti [84].

Umožňuje jak detekci, tak kvantifikaci produktu PCR v reálném čase, zatímco je daný produkt syntetizován. Využívají se dvě běžné metody ke zjištění a kvantifikaci produktu, které zahrnují: A) fluorescenční barviva, která nespecificky interkalují s dvouvláknovou DNA a B) sekvenčně specifické sondy DNA sestávající z fluorescenčně značených zpráv. Ty umožňují detekci pouze po hybridizaci sondy s jejím komplementárním DNA cílem [82].

Tyto metody jsou velice účinné. Pokrývají velký dynamický rozsah, ale mají problémy zahrnující vysoké experimentální náklady a reakční složitosti. Detekce miRNA, která je založená na qRT-PCR zahrnuje reverzní transkripci miRNA na cDNA [84].

Poté byla provedena PCR pomocí cDNA vázané sondy s kmenovou smyčkou jako šablona pro PCR a TaqMan sonda pro detekci fluorescence v reálném čase, která dosáhla úspěšné detekce miRNA s vysokou citlivostí a specificitou [75].

Pro dosažení vysoké citlivosti a reprodukovatelných výsledků detekce miRNA je třeba vzít v úvahu různé parametry. Jedná se hlavně o kontrolu integrity RNA, správný návrh primerů a syntézu DNA [84].

6. Elektrochemická detekce

Obrovský pokrok v bio medicíně v posledních letech má souvislost i s vývojem nové metody analýzy a detekce nukleových kyselin, bílkovin i polysacharidů. Jsou to metody, které by byly levnější, vyžadovaly jednodušší vybavení a pomocí metod by mohly být stanoveny rychle a paralelně co nejmenší objemy vzorků. Tyto důvody v bio medicínském výzkumu vedou k tomu, že se čím dál víc používají i metody založené na elektrochemické detekci, které mají naději tato kritéria splňovat [85].

Po objevu struktury dvojité šroubovice DNA se zvýšil zájem o chemické i biologické vlastnosti DNA. Roku 1957 Berg popsal, že polymerní DNA a RNA jsou polarograficky inaktivní. Stejnou dobou experimenty, které prováděl Emil Paleček na Biofyzikálním ústavu ČSAV v Brně (BFÚ), ukazovaly, že všechny báze DNA i RNA jsou polarograficky aktivní. Tyto báze lze i elektrochemicky stanovit při nízkých koncentracích [86]. Práce Emila Palečka, která byla publikována v prestižním Nature de facto, položila základ elektrochemie NK. Trvalo to ještě dalších 30 let než se díky pokroku v genomice, hlavně v sekvenování lidského genomu, začalo o elektrochemii NK zajímat větší počet laboratoří po celém světě [88].

Od roku 1990 počet prací na téma elektrochemie nukleových kyselin exponenciálně vzrostl a v současné době se pohybuje kolem 800 prací za rok. Skutečnost, která zapříčinila vzestup prací za rok, byla, že elektrochemická analýza se velmi dobře hodí ke zjišťování sekvencí nukleotidů v DNA a může být výhodná při jejich decentralizované analýze v menších nemocnicích. Tato analýza je vhodná i pro další účely, jako např.: interakce DNA s proteiny, detekce poškození DNA, stanovení mikroRNA, atd. [87].

Elektroanalýza je obor aplikované elektrochemie sdružující instrumentální měření, jimiž je společné, že je řídí elektrochemické principy, popř., že využívají elektrické a elektrochemické zákonitosti a veličiny [86]. Při elektrochemické detekci se zkoumá přenos elektronů mezi sledovanou látkou v roztoku a elektrodou, tedy její oxidace nebo redukce [87].

Tento přenos elektronů se projeví změnou sledovaného signálu (obvykle vznikem tzv. píku). Díky tomu lze zjistit např. přítomnost dané látky v prostředí (a dle velikosti signálu i koncentraci) nebo lze studovat i její strukturu či interakci s jinými molekulami [85].

Nejenom jednodušší látky s nízkou molekulovou hmotností (kovy a jejich komplexy, různé organické molekuly, atd.) se dají elektrochemicky studovat, ale i mnohem složitější biomakromolekuly včetně bílkovin nebo NK [88].

Elektrochemické detekční techniky zahrnují potenciometrické, konduktometrické, impedimetrické a amperometrické metody. Potenciometrie je založená na polymerních membránových iontově selektivních elektrodách (ISE) [89].

Za nejdůležitější detekční metody se považuje diferenční pulzní voltametrie (DPV), voltametrie čtvercových vln (SWV) a elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS), elektrochemiluminiscence (ECL), a dále také amperometrické a voltametrické měření [90].

6.1. Pracovní elektrody

V elektrochemii NK se využívají různé pracovní elektrody [91]. Volba pracovní elektrody může ovlivnit většinu parametrů dané elektroanalytické metody. Hlavně volbu vhodných analytů, citlivost a selektivitu, mez detekce i stanovitelnost [93].

První výsledky v oblasti výzkumu elektrochemie NK byly zaznamenány na rtuťových elektrodách (Hg elektrody). Kapající rtuťová elektroda (DME) a visící rtuťová elektroda (HMDE) jsou příklady Hg elektrod [91].

HMDE je na konci úzké kapiláry složena ze znovuobnovitelné kapky rtuti. Sklidila velký úspěch, ale i tak má nedostatky. Potřebuje přítomný zásobník rtuti, je rozměrná a vyžaduje i pravidelnou údržbu kapiláry. Jako další z velkých problémů je použití kovové rtuti. To vede k riziku otravy a kontaminaci či uvolnění rtuti. Některé nedostatky, co tu byly zmíněny lze odstranit použitím rtuťových filmových elektrod (HgFE), připravených pokrytím vhodného substrátu tenkým filmem kovové rtuti [93].

Další pracovní elektrodou, která neobsahuje rtuť je například uhlíková elektroda. Využívá se více typů těchto elektrod lišících se v chemických, adsorpčních a vodivostních vlastnostech, díky prostorové konfiguraci uhlíkových atomů. Mezi uhlíkové elektrody patří například pastové uhlíkové elektrody (CPE), elektrody z pyrolytického grafitu (PGE) a elektrody ze skelného uhlíku (GCE) [91].

6.2. Iontově selektivní elektrody (ISE)

ISE jsou iontově selektivní elektrody, nebo-li elektrochemické iontové senzory. Mají schopnost převádět aktivitu cílového iontu na elektrický potenciál jako měřitelný signál. V potenciometrii se spojují s referenčními elektrodami a používají se za podmínek blízkých nule [94].

Jsou to v principu indikační elektrody, jejichž základem je membrána. Membránou je schopen proniknout určitý ion nebo iontový útvar z vnějšího (měřeného) roztoku do prostředí tvořící vnitřní elektrolyt a stejný ion o známé koncentraci [86].

ISE se za posledního půlstoletí vyvinuly v dobře zavedené a rutinní analytické nástroje, které obsahují senzory pro více než 60 analytů. Z velké části jsou používány v různých oblastech, včetně klinické analýzy, fyziologie a řízení procesů [93]. ISE mají jedinečné vlastnosti jako je např., že poskytují informaci o koncentraci volných iontů (iontová aktivita), která se odlišuje od jiných analytických metod udávající celkovou koncentraci [89].

Sloukovi a kol. (2015) se povedlo vyvinout jednoduchou, levnou mikrofluidní platformu, bez značení a PCR, pro měření miRNA u rakoviny dutiny ústní s využitím komerčně dostupných heterogenních iontově selektivních nanoporézních membrán [92].

6.3. Voltametrie a polarografie

Termín voltametrie je obecný pro všechny techniky, u kterých je proud měřen jako funkce potenciálu elektrody. Vynálezce Jaroslav Heyrovský stojí na počátku vývoje voltametrické techniky, kterou pojmenoval polarografie [95].

Voltametrie a polarografie jsou elektroanalytické metody, při kterých se také používají elektrochemické články. Články jsou tvořeny pracovní polarizovanou elektrodou a referentní nepolarizovanou elektrodou [91].

Jaroslav Heyrovský použil kapkovou rtuťovou elektrodu jako pracovní elektrodu. Voltametrie s polarografií se používala jako synonyma. Teď se ale termín polarografie používá především pro "voltametrii s kapkovou rtuťovou elektrodou“ [95].

Podstata měření při polarografii je vnější elektrolýza na pracovní elektrodě, jejíž povrch se mění s časem a dokáže se i eventuálně periodicky obnovovat. Voltametrie je měření jehož podstatou je opět elektrolýza na pracovní elektrodě, která ale má konstantní povrch neměnící se s časem [86].

Druhy voltametrie jsou: cyklická voltametrie, lineární voltametrie, pulsní voltametrie, square-wave voltametrie (SWV), AC voltametrie a další. Výsledný záznam u polarografie i voltametrie se nazývá polarografická vlna/voltametrická křivka, kdy se sleduje závislost proud vs. potenciál [86, 91].

6.4. Amperometrické a voltametrické biosenzory

Biosenzory určené k detekci miRNA, které jsou založené na amperometrickém nebo voltametrickém měření, mají za cíl monitorování změny proudu při hybridizaci cílové miRNA s její komplementární sekvencí [96]. Voltametrie umožňuje měření proudu při zvyšování potenciálu danou rychlostí. Amperometrické měření umožňuje detekci analytu měřením proudu při konstantním potenciálu a vztažení naměřeného proudu ke koncentraci analytu [96, 97].

Voltametrie i amperometrie vyžadují dvou nebo tříelektrodové elektrochemické cely společně s potenciostatem, který umožňuje aplikaci potenciálu a měření získaného proudu [98].

Obecná funkce amperometrických biosenzorů je, že nejprve je protilátka označena elektroaktivní látkou, například enzymem [98] nebo nanočásticemi [97], struktura tohoto složení se může dále spojit s analytem prostřednictvím mezilehlé primární protilátky, a poté se koncentrace analytu kvantifikuje pomocí potenciálu a měření výsledného proudu. Biosenzory u amperometrie jsou velmi závislé na vlastnostech elektrody, protože signálová odezva vzniká v blízkosti povrchu senzoru a elektrody [98].

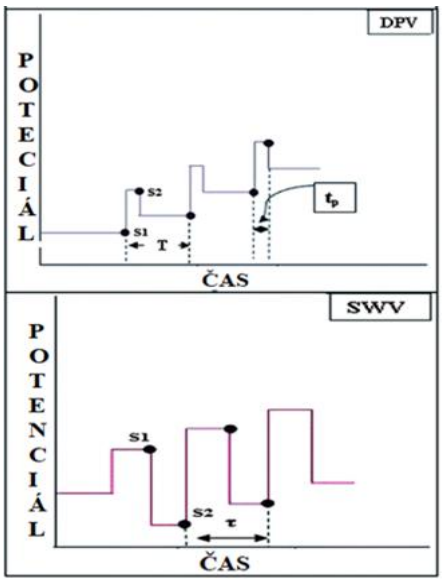
6.5. Diferenční pulzní voltametrie (DPV)

Diferenční pulzní voltametrie je elektrochemická metoda, která je založena na impulsním součtu lineárního potenciálu nebo stupňovitého potenciálu. Je to derivační metoda založená na amperometrickém a voltametrickém měření. Vzorkování proudu se provádí dvakrát, před a na konci impulzu. U DPV lze také díky sníženému rozdílu proudů výrazně snížit pozadí redoxního proudu nečistot. Jde o detekční metodu typickou pro stanovení miRNA, která může výrazně zvýšit citlivost [99].

6.6. Voltametrie s polarizačním napětím obdélníkového tvaru/Square Wave Voltammetry (SWV)

SWV společně s DPV patří mezi voltametrické techniky používající řízené napětí a analyzují výsledný proud [90, 100]. Jejich citlivost je kolem nanomol (nmol). SWV metoda vyžaduje méně času než DPV a je také o něco citlivější, díky minimální přítomnosti proudu pozadí. Je také třeba poznamenat, že použití a analýza výsledků DPV je jednodušší než SWV [90]. SWV je považována za jednu z nejpokročilejších forem voltametrických technik [101].

Průběh SWV se může považovat za zvláštní případ průběhu DPV, kde perioda před elektrolýzou (T) a perioda impulzu (tp) mají stejnou délku (viz. tab. 1). Proud je vzorkován dvakrát za cyklus, a to na konci každého impulsu [100].



Tabulka 1: Průběh DPV a SWV. Převzato a upraveno z: [100].

SWV metoda, díky tomu, že je schopna pracovat při vysoké frekvenci, je také často používána při stanovení mikroRNA. Experimenty, které využívají čtvercové vlny, mohou být provedeny rychle [100].

6.7. Elektrochemiluminiscence (ECL)

ECL je velmi citlivá, selektivní metoda analytické chemie [99]. ECL může být použita stejně jako fluorescence k vytvoření detekovaného optického signálu, který je úměrný koncentraci miRNA ve vzorku [102]. ECL patří mezi nejlepší metody v komerční klinické diagnostice, a proto je velmi doporučována [90]. Tato metoda má alternativní přístup k excitaci, která je založená na lampě nebo laseru. Elektrochemická excitace může vytvořit luminiscenční odezvu v přítomnosti ECL reportérové molekuly. Při tomto přístupu k excitaci, který je obecně reakcí na zapnutí, nevyžaduje použití laserů specifických vlnových délek k selektivní excitaci fluorescenčního barviva [102].

Wang a kol. (2020) úspěšně vyvinuli platformu pro snímání BPE-ECL na bázi papíru, která umožňuje detekci více druhů miRNA, jako jsou např. miRNA-155 [103].

Li a kol. (2022) úspěšně vyvinuli novou platformu ECL pro testování miR-21 s využitím technologie CHA (sestava katalytických vlásenek) a SPR (povrchová plasmová resonance) s výsledkem vynikající citlivosti a selektivní detekcí miR-21 s LOD 0,06 aM [104].

6.8. Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS)

EIS je široce používaná technika v nejrůznějších oblastech, jako je např. využití v medicíně. EIS je zejména díky dvěma faktorům považována za atraktivní metodu. Jako prvním faktorem je, že data EIS lze použít k získání fyzikálních vlastností, jako jsou difuzní koeficienty a rychlosti chemických reakcích, a mikrostrukturální charakteristiky zkoumaného elektrochemického systému (EC). Faktor dvě značí, že provedení experimentu EIS je relativně jednoduché. EIS je technika měřící impedanci elektrochemického systému v širokém rozsahu frekvencí [90, 105].

Konkrétně odhaduje přenosovou funkci mezi proudem a potenciálem. Měření EIS se systém EC vystaví malému sinusovému napětí nebo proudu pro danou sadu frekvencí. Současně se zaznamená výsledná sinusová proudová nebo napěťová odezva [105].

Deng a kol. (2014) připravili biosenzor pro profilování exprese miRNA. Díky kombinaci nábojově neutrálních PNA (peptidová nukleová kyselina) CPs (snímací sondy) a řízených depozicích PAn (polyanilin) vedlo k unikátnímu zesílení bezznačkového EIS biosenzoru pro miRNA. Bez potřeby značení miRNA byl postup analýzy značně zjednodušen. Pomocí využití řízené depozice, PAn poskytuje vhodný prostředek ke zvýšení citlivosti. Navržený biosenzor schopný analýzy reálného vzorku bez tepelného cyklování a s minimální přípravou vzorku, je atraktivním uchazečem pro vývoj jednoduchého a citlivého nástroje pro profilování exprese miRNA v různých onemocněních [106].

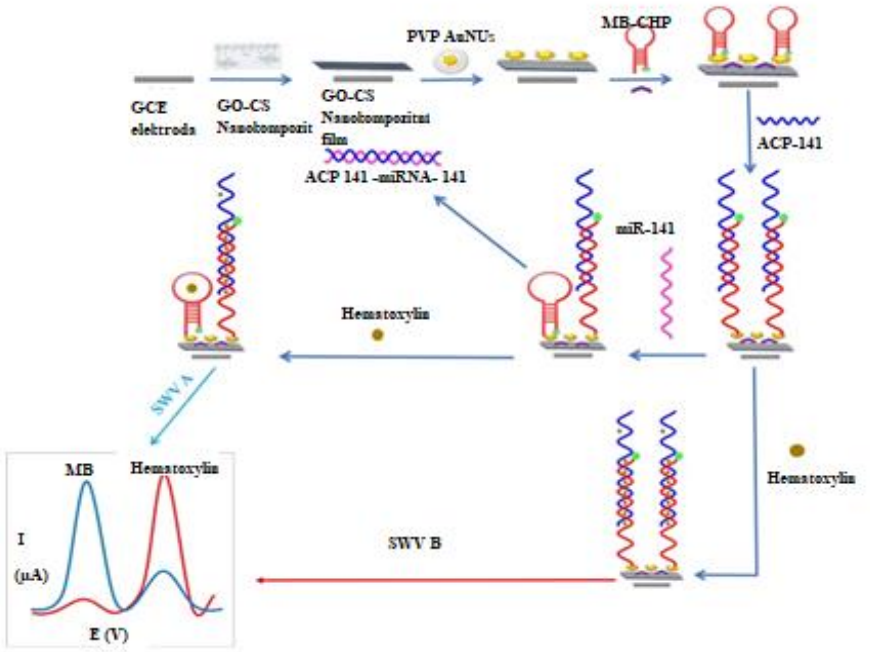
7. Elektrochemické biosenzory miRNA

V biomedicínské diagnostice jsou za inovativní a účinné nástroje považovány elektrochemické biosenzory. Za nejdůležitější komponenty patří biorozpoznávací prvek a převodník/detektor signálu, ty zachycují cílové analyty a mohou tak převádět biologické signály na elektrické [98, 99]. Díky schopnosti hybridizace a zachycování analytů je biorozpoznávací prvek složen z jedné nebo více sekvencí DNA. Elektrochemická bioanalýza potřebuje k provedení přítomnost redoxního činidla [90].

Při porovnání elektrochemických metod s ostatními analytickými, mají elektrochemické metody větší výhody díky své nízké ceně a selektivitě, proto mají široké využití v potravinářství, zemědělství, lékařství a v oblasti životního prostředí [96]. Vývoj biosenzorů se v posledním desetiletí zaměřil na miRNA [102]. Při detekci miRNA se většina elektrochemických biosenzorů spoléhá na komplementární hybridizaci mezi oligonukleotidovými vlákny a na zlepšení signálu pomocí modifikací např. nanomateriálů. Biosenzory využívají nanomateriály jako značky sond, ale také jsou nanomateriály modifikátory pracovních elektrod v biosenzorech. Díky tomu umožňují citlivou detekci analytu již při nepatrné koncentraci. Nanomateriály také hrají důležitou roli při vývoji elektrochemických biosenzorů různých analytů, jako jsou např. nádorové miRNA biomarkery [107].

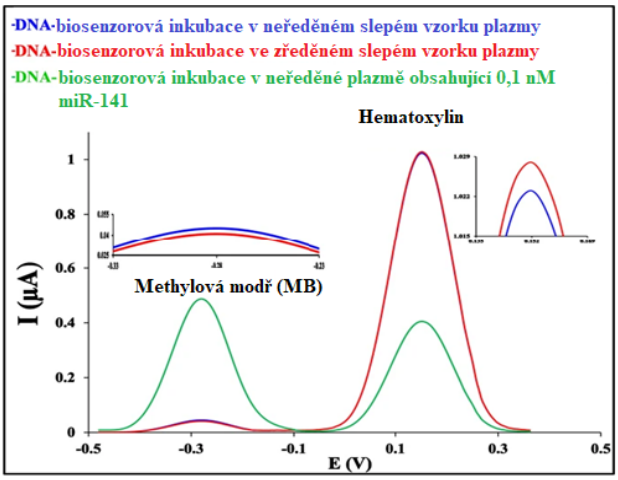
Khodadoust a kol. (2022) sestrojili elektrochemický biosenzor s funkční thiolovanou vlásenkouvou sondou, která byla na bázi dvouvrstvého nanokompozitního filmu (GO-CS/PVP-Au). Tento biosenzor zkonstruovali k meření miR-141 pro včasnou detekci u rakoviny plic. Byla použita elektroda ze skleného uhlíku (GCE/GO-CS/PVP-AuNUs), která byla modifikována nanokompozitní vrstvou GO-CS/PVP-AuNUs, jako vysoce stabilní a vysoce vodivostní substrát pro imobilizaci thiolované sondy [107]. Využili elektroaktivní značku MB (methylenová modř), ale také použili hematoxylin (HEM) jako pomocný elektrochemický indikátor, aby mohli měřit množství hybridizace i s jakou přesností biosenzor měří. Byla použita metoda SWV. Tato metoda byla provedena pomocí tříelektrodového systému, který zahrnoval pracovní elektrodu (modifikovaná GCE), referentní Ag/AgCl elektrodu a pomocnou elektrodu, kterou byla platinová elektroda. V prvním případě, u imobilizace a hybridizace, provedli redukování disulfidické vazby MB-HCP dle metody Tang a kol. (2019). Pro zabránění vzniku dipolymeru, záchytnou sondu ošetřili v bain-marie, a poté jí naředili v imobilizačním pufru a nechali inkubovat. Elektroda byla i zakryta plastovým víčkem, aby zabránili odpařování roztoku. DNA-biosenzor byl připraven po rozsáhlém opláchnutí promývacím pufrem. Provedli

EIS a CV analýzu pro potvrzení modifikací elektrody. Provedli i akumulaci HEM na biosenzoru DNA. Na obrázku 8 je znázorněno schéma uspořádání navrhovaného biosenzoru [108].



Obrázek 8: Schematické znázornění procesu konstrukce DNA-biosenzoru. Převzato a upraveno z: [108].

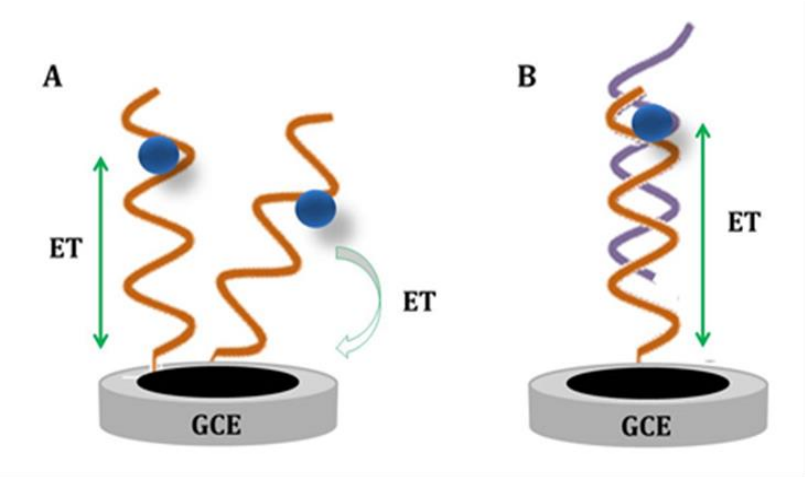
Díky významné roli včasného monitorování a detekce při léčbě rakoviny plic, byl navržený DNA-biosenzor použit k měření miR-141 ve vzorcích krevní plazmy. Užitečnost vyvinutého zařízení se vyhodnocuje na začátku celého analytického procesu, a to inkubací připraveného DNA-biosenzoru v neředěném slepém vzorku a ve vzorku plazmy obsahující miR-141. Tím, že koncentrace miR-141 v nenádorové plazmě je, stejně jako u ostatních miRNA, na nízké hodnotě nebo i nedetekované úrovni nižší než detekční limit připraveného DNA-biosenzoru, byla počáteční koncentrace miR-141 ve vzorku plazmy nižší než detekční limit metody. Proto byly přidány různé koncentrace miR-141 do desetkrát zředěného vzorku plazmy (s fosfátovým pufrem bez RNázy) [108]. (Viz. tab. 2)



Tabulka 2: Typické odezvy SWV během inkubace DNA-biosenzoru v neředěném slepém vzorku plazmy, inkubace v ředěném slepém vzorku plazmy a inkubace v neředěné plazmě obsahující 0,1 nM miR-141. Všechna data SWV byla získána při potenciálech v rozmezí od -0,5 V do 0,5V. Převzato a upraveno z: [108].

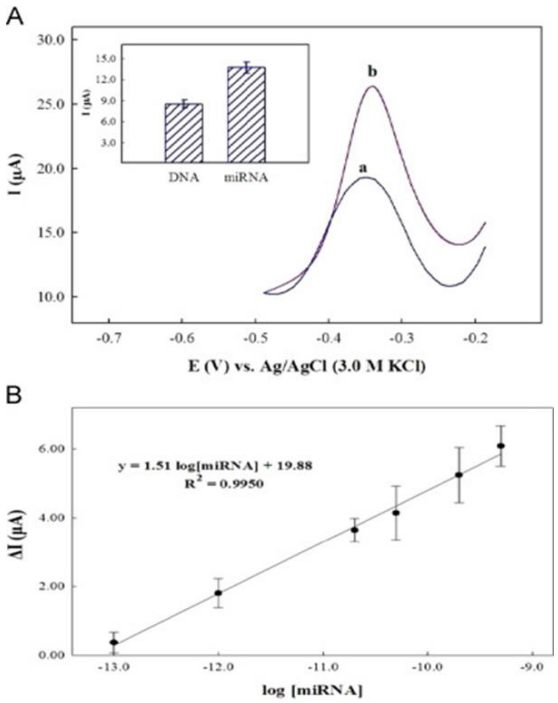
Výsledky prokázaly, že HEM použitý jako pomocný indikátor má větší interakci s dsDNA než ssDNA. Pomocí SWV bylo dosaženo širokého lineárního rozsahu koncentrace a nízkého detekčního limitu pro komplementární DNA (miR-141) na povrchu navrženého DNA-biosenzoru. Při použití komplementární sekvence (miR-141), byl detegován nárůst proudové odezvy MB a pokles odezvy kumulovaného HEM, ve srovnání s nekomplementární sekvencí. Khodadoust a kol. potvrdili, že navržený DNA-biosenzor lze použít k detekci miR-141 v časné klinické diagnostice nádorových onemocnění [108].

Hossain-Ali a kol. (2016) představili výhodnou a bezznačkovou platformu pro citlivou detekci miRNA na základě MB jako hybridizačního indikátoru. Při výrobě biosenzoru byla GCE (elektroda ze skleného uhlíku) nejdříve vyleštěna suspenzí oxidu hlinitého, poté byla sonikována ve směsi (ethanol/voda). Suspenzi MWCNT-COOH nakapali na vyčištěnou GCE a ponechali zaschnout. Poté provedli adsorpci záchytné sondy v imobilizačním pufru. Upravené elektrody poté opláchli PBS, aby došlo k odstranění veškerých přebytků MB. Zjistili, že získaný elektrochemický signál odpovídá pouze MB navázanému na sekvenci miRNA. Závěrem změřili oxidační proud MB pomocí DPV v PBS. Elektrochemický signál MB porovnali před hybridizací a po ní. Podstatné zvýšení vrcholového proudu se přičítá koncentraci cílové miRNA. Na obrázku 9 je znázorněn princip analýzy bezznačkového elektrochemického biosenzoru miRNA [109].



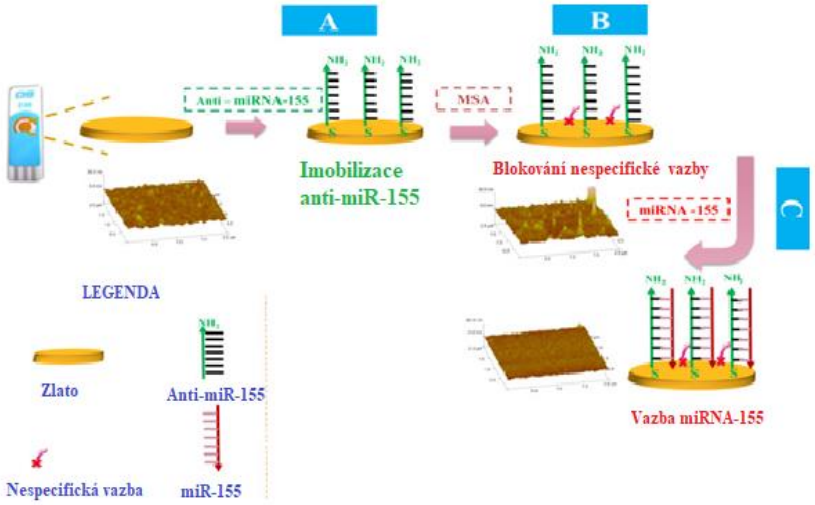
Obrázek 9: Schéma možných způsobů reakce MB ET s povrchem (A) ss-DNA/MWCNT-COOH/GCE, směrová a (B) miRNA/ DNA/MWCNT-COOH/GCE, zprostředkovaná miRNA/DNA. Převzato a upraveno z: [109].

Pro specifickou detekci miRNA-21 byl použit rozdíl elektrochemické odezvy MB na modifikovaných elektrodách imobilizovaných ss-DNA před a po hybridizaci. Tímto postupem dosáhli lineárního rozsahu od 0,1 do 500,0 pM s detekčním limitem 84,3 fM metodou DPV (viz. tab. 3). Navrhovaný test vylučuje použití jakéhokoli značení ss-DNA nebo miRNA, enzymu, složitého procesu nebo drahých bioreagencí, tudíž je tento postup výrazně zjednodušen. Z výsledků vyplynulo, že tento elektrochemický biosenzor miRNA představuje pozoruhodné výhody, jako je levná jednoduchá příprava, relativně rychlý a širší lineární rozsah [109].



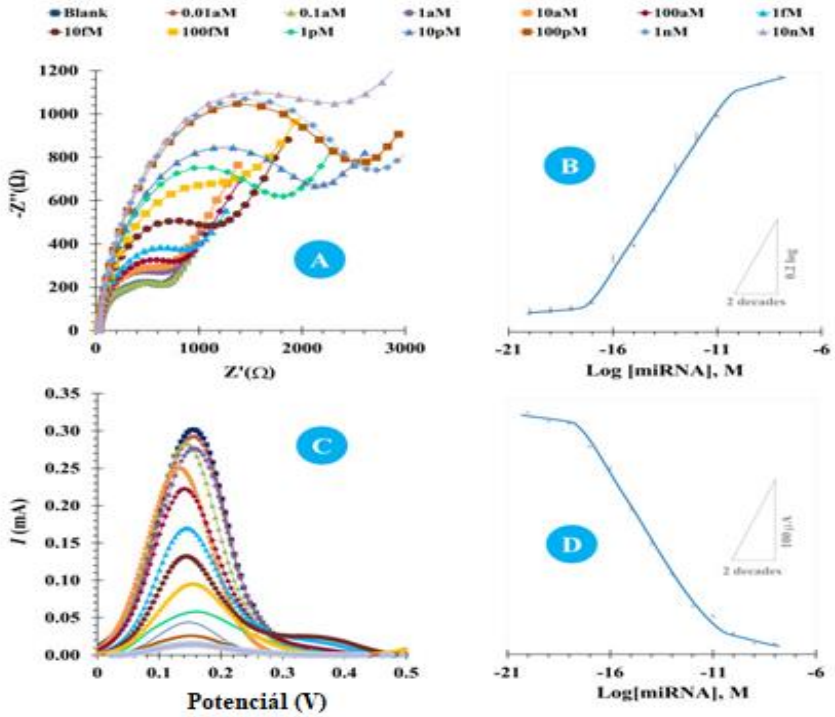
Tabulka 3: Histogramy s chybovými úsečkami oxidačních signálů MB. (A) DPV křivky pro oxidaci MB na (a) DNA/MWCNT-COOH/GCE (Epa=-0,338) a (b) miRNA/ss-DNA/MWCNT-COOH/GCE (Epa=-0,358). (B) Vztah mezi ΔI a logaritmem koncentrace miRNA-21. Datové body představují tři opakování. Převzato z: [109].

Cardoso a kol. (2016) popsali jednoduchý biosenzorický design umožňující vytvoření ultrasenzitivního elektrochemického biosenzoru pro detekci biomarkeru rakoviny u miR-155. MiR-155 vybrali pro svou nadměrnou expresi u rakoviny prsu. Při této studii použili biorozpoznávací prvek, komplementární oligonukleotid, který byl syntetického původu a byl také jednoduše imobilizován na Au-SPE (zlatá tištěná elektroda). Biosenzor syntetizovali ve dvou krocích. V prvním kroku provedli inkubaci anti-miRNA-155 s DTT (dithiotreitol) na pevné ploše Au-SPE. Ve druhém kroku byly nespecifické vazebné oblasti blokovány inkubací senzorového povrchu s MSA. Hybridizaci sondy s cílovou miRNA-155 provedli s více standardními roztoky miRNA-155, které připravili v pufru nebo ve slepém séru [110]. (Viz. obr. 10)



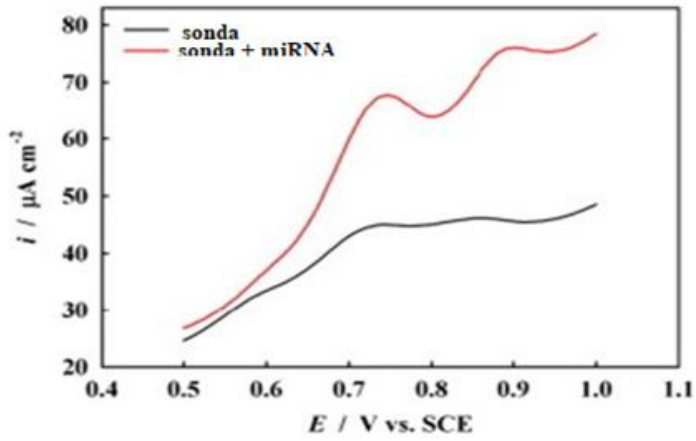
Obrázek 10: Obrázek elektrochemického biosenzoru pro detekci miRNA-155. (A) Imobilizace Anti-miRNA155 na zlatém povrchu; (B) Blokování nespecifické vazby a (C) Hybridizace s miRNA-155. Převzato a upraveno z: [110].

Z hlediska analytického, byl biosenzor schopen detekovat i velmi nízké koncentrace miRNA-155, a to až 1-10 aM na pozadí séra (viz. tab. 4). To brali jako důležitou vlastnost vyrobeného biosenzoru, neboť umožňuje vyšší stupeň ředění vzorku, a tedy překonání interference jakékoli nežádoucí biomolekuly vzniklé, v důsledku abnormálního fyziologického stavu. Navíc, by zařízení mohlo být opakovaně použito při po sobě jdoucích odečtech nových roztoků, zejména při odečtech EIS. Vykazovalo by přitom vynikající selektivitu vůči ostatním proteinům v biologických tekutinách a buněčných extraktech z jiné nádorové choroby. Tuto snadnou a citlivou metodu považují za slibný přístup pro současnou kvantitativní analýzu více miRNA-155 ve fyziologických tekutinách, v biomedicínském výzkumu a v diagnostice POC (point-of-care) [110].



Tabulka 4: Měření EIS (A) a SWV (C) a odpovídající kalibrační křivky (B a D) v 5,0×10^{-3} M $[Fe(CN)_6]^{3-}$ a 5,0×10^{-3} M $[Fe(CN)_6]^{4-}$ ve standardních roztocích připravených na pozadí slepého lidského séra, pH 7,4, s různou koncentrací miRNA-155. Převzato a upraveno z: [110].

Li a kol. (2014) se pokoušeli o vyvinutí jednoduchého a citlivého elektrochemického biosenzoru pro detekci miR-24 sledováním oxidačního signálu guaninu. K vývoji biosenzoru využili vícestěnné uhlíkové nanotrubičky (MWCNT) [110]. Pomocí DPV v PBS obsahující guanin, Li a kol. zkoumali elektrochemickou oxidaci guaninu na MWCNTs/GC elektrodě v rozsahu potenciálů 0,5-0,9 V. DPV parametry jim vycházeli následovně: přírůstek potenciálu 4 mV; amplituda 50 mV; perioda pulzu 0,2 s. Pro srovnání byla zkoumána také elektrochemická oxidace guaninu na GC elektrodě [111]. (Viz. tab. 5)



Tabulka 5: DPV křivky sonda/MWCNTs/GC elektrody před (černá čára) a po (červená čára) hybridizaci s miRNA-24. Elektrolyt, čistý PBS (pH 7,38); koncentrace sondy a miRNA-24 jsou 1 μM a 10 nM. Převzato a upraveno z: [111].

Li a kolektiv nakonec dokázali vyvinout jednoduchý a citlivý elektrochemický biosenzor miRNA-24 na bázi MWCNT. Připravené sonda/MWCNT/GC elektrody má za optimálních podmínek dobrou citlivost, specifičnost i přijatelnou výtěžnost, nízký detekční limit (1pM) a reprodukovatelnost pro stanovení miRNA-24. Oproti stávajícím metodám detekce miRNA je biosenzor na bázi MWCNT založen přímo na změně signálu oxidace guaninu, což eliminuje potřebu specifické záchytné sondy, hybridizačních značek a použití drahého kitu nebo toxických chemikálií. Navržený biosenzor na bázi MWCNT může nalézt široké uplatnění při rutinní detekci miRNA [111].

ZÁVĚR

Před třiceti lety byly objeveny malé nekódující molekuly RNA, které mají potenciál regulovat více než polovinu lidských kódujících genů. Jejich studiem se čím dál více zabývají různé laboratoře po celém světě. Bylo zjištěno mnoho druhů mikroRNA, které souvisejí ¨např. s onemocněním rakovinou.

Stanovení mikroRNA je důležité, velký rozvoj detekčních metod pro jejich detekci stále roste a zdokonaluje se. Za standardní metody se považují Northern blotting, Microarrays nebo také RT-PCR.

Čím dál častěji používané metody jsou elektrochemické metody a biosenzory. Mezi nejdůležitější elektrochemické metody patří DPV, SWV, EIS, ECL, amperometrické a voltametrické diagnostické techniky. Biosenzory využívají biologický prvek spojený s elektrochemickou metodou za vzniku signálu. Je vyvinuto a stále se vyvíjí nové biosenzory pro detekci miRNA. Biosenzory uskutečňují citlivou detekci a také v některých případech využívají jako značky sond, nanomateriály. Biosenzory, které byly úspěšně vyvinuty pomocí modifikace různých elektrod jsou např. DNA-biosenzory s funkční thiolovanou vlásenkovou sondou pro miR-141 nebo byl vyvinut bezznačkový biosenzor pro detekci miRNA, díky kterému je detekce rychlejší.

POUŽITÁ LITERATURA

[1] Blackburn, G. M. et al. 2022. Nucleic acids in chemistry and biology. 4th. Vyd. London: Royal Society of Chemistry. ISBN 9781788019040;1788019040.

[2] Dahm, R. Friedrich Miescher and the Discovery of DNA. Developmental Biology. 2005. 278 (2), 274-288.

[3] Madden, D. Discovering DNA. School science review. 2003. 84: 36-38.

[4] Lydon, J., E. The DNA double helix—the untold story. Liquid Crystals Today. 2003, 12 (2), 1-9, DOI: 10.1080/14645180310001603962

[5] Thompson, J., Braun, G., Tierney, D., Wessels, L., Schmitzer, H., Rossa, B., Wagner, H. P., Dultz, W. Rosalind Franklin's X-ray photo of DNA as an undergraduate optical diffraction experiment. American Journal of Physics, 2018; 86 (2): 95–104.

[6] Blanco, A. and G. Medical biochemistry. 2017. London;San Diego;Cambridge;Oxford. Elsevier. ISBN 9780128035504;0128035501.

[7] Roberts, R., J. Nucleic acid. Encyclopedia Britannica, 26 Feb. 2020, https://www.britannica.com/science/nucleic-acid. Accessed 4 June 2022.

[8] Cost dos, S., G., Renovato-Martins, M.; DE BRITO, Mesquita N. The remodel of the "central dogma". A metabolomics interaction perspective. Metabolomics, 2021, 17: 1-15.

[9] PRAMANIK, D., et al. CRISPR-mediated engineering across the central dogma in plant biology for basic research and crop improvement. Molecular Plant, 2021, 14.1: 127-150.

[10] Hausser, J., et al. Central dogma rates and the trade-off between precision and economy in gene expression. Nature communications, 2019, 10.1: 68.

[11] Snyder, M. Genomics and Personalized Medicine: What Everyone Needs to Know. New York: Oxford University Press, Incorporated, 2016. ISBN 0190234768;9780190234768.

[12] Králíková, M., et al. Biochemie pro biomedicínské techniky. Masarykova univerzita, 2021. ISBN 8021098570;9788021098572.

[13] Liu, S., et al. Understanding the role of non-coding RNA (ncRNA) in stent restenosis. Atherosclerosis, 2018, 272: 153-161.

[14] Monosaccharides – Carbohydates – University of Maine. The University of Maine [online], [citováno 23.3. 2024] Dostupné z: https://umaine.edu/carbohydrates/carbohydrate-chemistry/monosaccharides/#top

[15] Kodíček, M. et al. 2022. Biochemie: chemický pohled na biologický svět. 3.přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 8075921240;9788075921246;

[16] Přispěvatelé WikiSkript, Primární struktura nukleových kyselin [online]. c2016, Datum poslední revize 30. 10. 2016, 12:01 UTC, [citováno 1.6. 2023]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Prim%C3%A1rn%C3%AD_struktura_nukleov%C3%BDch_kyselin&oldid=359499>

[17] Devine, KG., Jheeta, S. De Novo Nucleic Acids: A Review of Synthetic Alternatives to DNA and RNA That Could Act as Bio-Information Storage Molecules. Life. 2020; 10(12):346.

[18] Crick, F., Compton, H., Watson, J., Dewey. The complementary structure of deoxyribonucleic acid. The Royal Society Publishing. 1954 April, 223, 80-96

[19] Francis, Z., Stzpcyznska, A. Clustering algorithms in radiobiology and DNA damage quantification. Data mining: New technologies, benefits and privacy concerns, 2013.

[20] Quellete,R., J., Rawn, D.,J. 30 - Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids. Editor(s): Robert J. Ouellette, J. David Rawn. Organic Chemistry (Second Edition). Academic Press. 2018.Pages 973-1000.

[21] Phan, Ch.-W., et al. A review on the nucleic acid constituents in mushrooms: Nucleobases, nucleosides and nucleotides. Critical reviews in biotechnology, 2018, 38.5: 762-777.

[22] Carrey, E., A., Perrett, D., Simmonds, H., A. Nucleic Acids, Purine, and Pyrimidine Nucleotides and Nucleosides: Physiology, Toxicology, and Dietary Sources. Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition). 2013, 189-196, ISBN 9780123848857

[23] Kerlin, L., Roy, Li, Xiantang. Chapter 24 – Pathology in Non-Clinical Drug Safety Assessment,. Haschek and Rousseaux‘s Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition). 2013, 725-750, ISBN 9780124157590

[24] Lopez-Gomollon, S., Esteban, N., F. Purification of DNA oligos by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). In: Methods in enzymology. Academic Press, 2013. p. 65-83.

[25] Sohrabi, N., et al. Basics of DNA biosensors and cancer diagnosis. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2016, 44.2: 654-663.

[26] Mastering Pharmacogenomics: A Nurse‘s Handbook for Success – Dále, H., Lea, Cheek, J., Denis, Brazeau, Daniel, Brazeau, Gayle- Knihy google. Knihy *Google* [online]. Dostupné z: Mastering Pharmacogenomics: A Nurse‘s Handbook for Success – Systém Halsey Lea, Dennis J. Cheek, Daniel Brazeau, Gayle Braz–au - Knihy Google

[27] Stone, C., L. 2004. The Basics of Biology. 1st. vyd. British Library Cataloguing in Publication Data. ISBN 0-313-31786-0

[28] Sinden, R.R. 2012, DNA Structure and Function. Elsevier Science. ISBN 0080571735;9780080571737

[29] Kunst, B., C., Warren, T., S. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. Cell 77, (1994), 853-861.

[30] Rich, A., Zhang, S. Z-DNA: the Long road to biological function. Nature Reviews Genetics. 2013, 4(7), 566-572, doi: 10.1038/nrg1115

[31] Heinemann U, Roske Y. Symmetry in Nucleic-Acid Double Helices. Symmetry. 2020; 12(5):737.

[32] Trifunovic, A. Mitochondrial DNA and ageing. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. 2006, 1757(5-6), 611-617, ISSN 0005-2728.

[33] Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. International journal of medical microbiology, 2013, 303.6-7: 298-304.

[34] Diogo, M., M., Queiroz, A., J., Prazeres, M., F., D. Chromatography of plasmid DNA. Journal of Chromatography A. 2005, 1069(1), 3-22, ISSN 0021-9673.

[35] Lukáčová, Al., Vesteg, M. Mnohonásobné nezávislé straty schopnosti fotosyntézy v evolúcii eukaryotov a metabolizmus nefotosyntetických plastidov. Chemické listy, 2022, 116.5: 316-323.

[36] Hermann, R., G., and Possingham, J., V. Plastid DNA – The Plastome, Chloroplasts. 1980, 45-96, doi: 10.1007/978-3-540-38255-3_3

[37] Sakatani Y, Ichihashi N, Kazuta Y, Yomo T. A transcription and translation-coupled DNA replicatsystémstem using rolling-circle replication. Scientific Reports. 2015 May 27;5:10404.

[38] Lee, CY, Myong, S. Probing steps in DNA transcription using single-molecule methods. J Biol Chem. 2021 Sep;297(3):101086.

[39] Paulová, H. a kolektiv autorů. 2021. Biochemie pro nelékařské zdravotnické obory. 1. vydání. Vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 8021098589;9788021098589

[40] Clancy, S. & Brown, W. (2008) Translation: DNA to mRNA to Protein. Nature Education 1(1):101

[41] Mokobi F. Protein Synthesis (Translation)- Definition, Enzymes, Steps, Inhibitors. Microbe Notes. October 8. 2021.

[42] Lilijas, A. et al. 2017. Textbook of structural biology. Second. Vyd. Beijing;Singapore;Hong Kong;Chennai;Shanghai;Tokyo;Taipei;London;New Jersey;:World Scientific. ISBN 9789813142473;9813142472.

[43] Shank, N. Non-natural nucleic acids: methods and protocols. New York: Humana Press, 2019. ISBN 1493992155;9781493992157.

[44] Elliot, D., Ladomery M. Molecular biology of RNA. Second. Vyd. Oxford: Oxford University Press. 2016. ISBN 9780199671397;0199671397.

[45] Ledvina, M. et al. 2020. Biochemie pro studující medicíny. 3. vydání. Vyd. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 9788024647487

[46] Campbell, M., K., Farrel,S., O., McDougal, O., M. Biochemistry. 9th.vyd. Singapore;Unite States;Brazil;Mexico;United Kingdom;Australia;: Cengage Learning. 2018. ISBN 9781305961135;9781305961951;1305961137;1305961951;

[47] Anonymous. Ribosome Biogenesis: Methods and Protocols. Karl-Dieter ENTIAN, ed. New YORK, NY: Springer Nature. 2022. ISBN 9781071625019;1071625012;

[48] Paul, J., Muthuswami, R. MicroRNA: Perspectives in Health and Diseases. CRC Press, 2018.

[49] Acunzo, M. et al. MicroRNA and cancer – A brief overview. Advances in biological regulation. 2015. roč. 57, s. 1-9

[50] Lu, T., X., Rothenberg, M., E. MicroRNA. Journal of allergy and clinical imunology. 2018. roč. 141, č. 4, s. 1202-1207.

[51] Santulli, G. microRNA: Basic Science: From Molecular Biology to Clinical Practice. Gaetano Santulli, ed. 1st. 2015. vyd. Cham: Springer International Publishing, 2015. ISBN 0065-2598.

[52] Cretoiu, D., Xiao, J., Das, S., eds. (2020). MicroRNA Signaling. Lausanne: Frontiers Media SA. doi: 10.3389/978-2-88966-289-0

[53] Subramanian, S., and Steer J. C. "Special Issue: MicroRNA Regulation in Health and Disease." Genes vol. 10,6 457. 15 Jun. 2019, doi:10.3390/genes10060457

[54] Ing Liu, Jiuyong Li, Murray J. Cairns. Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings in Bioinformatics*. January 2014,15 (1), 1–19

[55] Carthew W. Richard, Sontheimer J. Erik. Origin and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009 February. 136(4), 642-55.

[56] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA. Cell. 2013 Apr 25,153(3), 516-519.

[57] Jung, Hwa & Suh, Yousin. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. Frontiers in genetics. 2014. 5. 472. 10.3389/fgene.2014.00472.

[58] Vannini, I., Fanini, F., Muller, F. Emerging roles of microRNA in cancer. Current opinion in genetics & development. 2018, roč. 48, s. 128-133.

[59] Reddy, Kaladhar B. MicroRNA (miRNA) in cancer. Cancer cell international. 2015. roč. 15, č. 1, s. 38-38.

[60] Chawla, Jatinder Pal Singh, et al. Role of miRNA in cancer diagnosis, prognosis, therapy and regulation of its expression by Epstein–Barr virus and human papillomaviruses: with special reference to oral cancer. Oral Oncology, 2015, 51.8: 731-737.

[61] Liu, H., et al. Myofibroblast-specific YY1 promotes liver fibrosis. Biochemical and biophysical research communications, 2019, 514.3: 913-918.

[62] Kurozumi, A., et al. DNA Methylation and Dysregulation of miRNA in Cancer: Feedback Loop Between Dysregulated miRNAs and Epigenetic Pathways in Cancer. In: . Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 281–296. DNA and Histone Methylation as Cancer Targets. ISBN 2196-9906.

[63] Boldrini L, Giordano M, Melfi F, Lucchi M, Fontanini G. Expression of miRNA-25 in young and old lung adenocarcinoma. J Res Med Sci. 2021 Dec 22;26:132. doi: 10.4103/jrms.JRMS_830_19. PMID: 35126595; PMCID: PMC8772505.

[64] Sárközy M., Kahán Z., Csont T. A myriad of roles of miR-25 in health and disease. Oncotarget. 2018; 9: 21580-21612.

[65] Kim, Kimberly H. a Charles W. M. ROBERTS. Targeting EZH2 in cancer. Nature medicine. 2016, roč. 22, č. 2, s. 128–134.

[66] Chen, J., et al. MiRNA-26a Contributes to the Acquisition of Malignant Behaviors of Doctaxel-Resistant Lung Adenocarcinoma Cells through Targeting EZH2. Cellular physiology and biochemistry. 2017, roč. 41, č. 2, s. 583–597.

[67] Kurozumi, A., et al. Regulation of the collagen cross-linking enzymes LOXL2 and PLOD2 by tumor-suppressive microRNA-26a/b in renal cell carcinoma. International journal of oncology, 2016, 48.5: 1837-1846.

[68] Monteleone, K., Selvaggi, C., Cacciotti, G. et al. MicroRNA-29 family expression and its relation to antiviral immune response and viro-immunological markers in HIV-1-infected patients. BMC Infect Dis 15, 51 (2015).

[69] Torbati, P., M., ASADI, F., FARD-ESFAHANI, P. Circulating miR-20a and miR-26a as biomarkers in prostate cancer. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 2019, 20.5: 1453.

[70] Chen, D. I., et al. MicroRNA-30d-5p inhibits tumour cell proliferation and motility by directly targeting CCNE2 in non-small cell lung cancer. Cancer letters, 2015, 362.2: 208-217.

[71] Shi L, Wang Z, Geng X, Zhang Y, Xue Z. Exosomal miRNA-34 from cancer-associated fibroblasts inhibits growth and invasion of gastric cancer cells in vitro and in vivo. Aging (Albany NY). 2020 May 10;12(9):8549-8564. doi: 10.18632/aging.103157. Epub 2020 May 10. PMID: 32391804; PMCID: PMC7244055.

[72] Zhou Z, Xu H, Duan Y, Liu B. MicroRNA-101 suppresses colorectal cancer progression by negative regulation of Rap1b. Oncol Lett. 2020 Sep;20(3):2225-2231. doi: 10.3892/ol.2020.11791. Epub 2020 Jul 1. PMID: 32782539; PMCID: PMC7400857.

[73] Guan H, Dai Z, Ma Y, Wang Z, Liu X, Wang X. MicroRNA-101 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by targeting EYA1 in breast cancer. Int J Mol Med. 2016 Jun;37(6):1643-51. doi: 10.3892/ijmm.2016.2557. Epub 2016 Apr 11. PMID: 27082308.

[74] Zhang, W., et al. miRNA-185 serves as a prognostic factor and suppresses migration and invasion through Wnt1 in colon cancer. European journal of pharmacology, 2018, 825: 75-84.

[75] Cheng, Y., et al. Recent advances in microRNA detection. Analyst (London). 2018, roč. 143, č. 8, s. 1758–1774.

[76] LIU, Y., et al. A sensitive and specific method for microRNA detection and in situ imaging based on a CRISPR-Cas9 modified catalytic hairpin assembly. RSC advances. 2020, roč. 10, č. 47, s. 28037–28040.

[77] Yunlei Zhou, Huanshun Yin, Jie Li, Bingchen Li, Xue Li, Shiyun Ai, Xiansheng Zhang. Electrochemical biosensor for microRNA detection based on poly(U) polymerase mediated isothermal signal amplification. Biosensors and Bioelectronics. Volume 79. 2016. Pages 79-85.

[78] AHMAD, W., et al. A comprehensive analysis of northern versus liquid hybridization assays for mrnas, small rnas, and mirnas using a non-radiolabeled approach. Current Issues in Molecular Biology. 2021, roč. 43, č. 2, s. 457–484.

[79] Válóczi, An., et al. “Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes.” Nucleic acids research vol. 32,22 e175. 14 Dec. 2004, doi:10.1093/nar/gnh171

[80] Mantione, Kirk J., et al. Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq. Medical science monitor basic research, 2014, 20: 138.

[81] Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., Moue, A., & Setu, M. (2013). Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. Anwer Khan Modern Medical College Journal, 4(1), 30–36.

[82] Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. J Invest Dermatol. 2013;133(3):1-4.

[83] Yan, J., et al. One-step real time RT-PCR for detection of microRNAs. *Talanta*, 2013, 110: 190-195.

[84] Kim, K., J. et al. Real-time qRT-PCR assay for the detection of miRNAs using bi-directional extension sequences. Analytical biochemistry. 2017, roč. 536, s. 32–35.

[85] Bartošík, M., Paleček, E., VOJTĚŠEK, B. Elektrochemická analýza nukleových kyselin, bílkovin a polys charidů v bio medicíně. Klinická onkologie, 2014, 27.3.

[86] Švancara, Ivan. Elektroanalýza. 2019.

[87] Paleček, E., Ostatná, V., Pechan, Z. 55 Let Elektrochemie nukleových Kyselin. Chem. Listy 2014, 108, 490-499.

[88] Bartošík, M. Současné trendy v elektrochemii nukleových kyselin. Chemické listy, 2014, 108.5: 500-506.

[89] DING, J., QIN, W. Recent advances in potentiometric biosensors. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 124: 115803.

[90] Negahdary, M., Angnes, L. Application of electrochemical biosensors for the detection of microRNAs (miRNAs) related to cancer. Coordination Chemistry Reviews, 2022, 464: 214565.

[91] Rozkošná, J. Studium modifikace DNA nesoucí 7-deaza analogy purinových bází komplexy oxidu osmičelého a možností jejího analytického využití.

[92] Slouka, Z., et al. Integrated, DC voltage-driven nucleic acid diagnostic platform for real sample analysis: Detection of oral cancer. Talanta, 2015, 145: 35-42.

[93] Dvořák, P., Vyskočil, V., Netradiční filmové elektrody ve voltametrické a ampérometrické analýze organických sloučenin. Chemické listy, 2023, 117.1: 3-12.

[94] Hu, J., Stein, A., BÜHLMANN, P. Rational design of all-solid-state ion-selective electrodes and reference electrodes. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016, 76: 102-114.

[95] Scholz, F. Voltammetric techniques of analysis: the essentials. ChemTexts, 2015, 1.4: 17.

[96] Kilic, T., et al. microRNA biosensors: Opportunities and challenges among conventional and commercially available techniques. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 99: 525-546.

[97] Labib, M., Berezovski, M., V. Electrochemical sensing of microRNAs: avenues and paradigms. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 68: 83-94.

[98] Topkaya, Seda Nur; Azimzadeh, M., Ozsoz, M. Electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection: Recent advances and challenges. Electroanalysis, 2016, 28.7: 1402-1419.

[99] Zhang, C., et al. Progress in miRNA Detection Using Graphene Material–Based Biosensors. Small, 2019, 15.38: 1901867.

[100] Chen, A., Shah, B. Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry. Analytical Methods, 2013, 5.9: 2158-2173.

[101] Mirceski, V., Skrzypek, S., Stojanov, L. Square-wave voltammetry. ChemTexts, 2018, 4: 1-14.

[102] Graybill, R., M.; Bailey, R., C. Emerging biosensing approaches for microRNA analysis. Analytical chemistry, 2016, 88.1: 431-450.

[103] Wang, F., et al. based bipolar electrode electrochemiluminescence platform for detection of multiple miRNAs. Analytical Chemistry, 2020, 93.3: 1702-1708.

[104] Li, J., Cai, R., Tan, W. A Novel ECL Sensing System for Ultrahigh Sensitivity miRNA-21 Detection Based on Catalytic Hairpin Assembly Cascade Nonmetallic SPR Effect. Analytical Chemistry, 2022, 94.36: 12280-12285.

[105] Ciucci, F. Modeling electrochemical impedance spectroscopy. Current Opinion in Electrochemistry, 2019, 13: 132-139.

[106] Deng, H., et al. A highly sensitive microRNA biosensor based on hybridized microRNA-guided deposition of polyaniline. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 60: 195-200.

[107] Low SS, Ji D, Chai WS, Liu J, Khoo KS, Salmanpour S, Karimi F, Deepanraj B, Show PL. Recent Progress in Nanomaterials Modified Electrochemical Biosensors for the Detection of MicroRNA. Micromachines. 2021; 12(11):1409.

[108] Khodadoust, A., et al. A ratiometric electrochemical DNA-biosensor for detection of miR-141. Microchimica Acta, 2022, 189.6: 213.

[109] Rafiee-Pour, H., A., Behpour, M., Keshavarz, M. A novel label-free electrochemical miRNA biosensor using methylene blue as redox indicator: application to breast cancer biomarker miRNA-21. Biosensors and bioelectronics, 2016, 77: 202-207.

[110] Cardoso, A., R., et al. Novel and simple electrochemical biosensor monitoring attomolar levels of miRNA-155 in breast cancer. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 80: 621-630.

[111] Li, F., et al. “Carbon nanotube-based label-free electrochemical biosensor for sensitive detection of miRNA-24.” Biosensors & bioelectronics vol. 54 (2014): 158-64. doi:10.1016/j.bios.2013.10.061