

SLEDOVÁNÍ GLYKOSYLACE LEKTINOVÝMI BIOČIPY A BIOSENZORY VYUŽÍVAJÍCÍMI POVRCHOVOU PLASMONOVOU REZONANCI

ALENA ŠEDIVÁ a JAROSLAV KATRLÍK

Oddelenie glykobiotechnológie, Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava
a.sediva@savba.sk, chemjkat@savba.sk

Došlo 25.2.15, přepracováno 10.5.16, přijato 10.8.16.

Klíčová slova: biočip, biosenzor, glykosylace, lektin, povrchová plasmonová rezonance, SPR

Obsah

1. Úvod
2. Definice, charakteristika
 - 2.1. Biosenzor
 - 2.2. Využití biosenzorů v praxi
 - 2.3. Biočip
3. Glykosylace a její význam
4. Lektiny
 - 4.1. Rostlinné lektiny
 - 4.2. Živočišné lektiny
 - 4.3. Houbové lektiny
 - 4.4. Bakteriální lektiny
 - 4.5. Funkce lektinů
 - 4.6. Využití lektinů
5. Biosenzory a biočipy využívající lektiny
6. Lektinová SPR
 - 6.1. Princip SPR
 - 6.2. Aplikace SPR s využitím lektinů
 - 6.3. SPR imaging
7. Závěr

1. Úvod

Výzkum a vývoj biosenzorů má výrazný interdisciplinární charakter a kromě úzce zaměřené bioanalytické chemie zasahuje i do takových oborů jako např. biologie, chemie, fyzika a matematika. Využití biosenzorů v dnešní době doplňuje a v některých případech i nahrazuje klasické analytické metody, jako je např. plynová nebo kapalinová chromatografie. Jejich aplikace umožňuje rychlé analýzy vzorků a minimalizuje nároky na jejich přípravu. Jedná se přitom o vysoce citlivé a rychlé metody, které umožňují měření velkého množství vzorků. Použití biosenzorů umožňuje miniaturizaci, přičemž měření mohou probíhat *in vivo* i *in vitro* při biologických a biomedicínských měřeních. Jejich využití je obrovské,

najdeme je v medicíně, v průmyslu farmaceutickém, potravinářském, biotechnologickém, ale i např. v zemědělství a ve vojenství.

První zkoumané a vyvinuté biosenzory byly založené na elektrochemické detekci. Vývoj elektrochemie v této oblasti odstartovala koncepce redoxního potenciálu spolu s měřením pH na začátku 20. století. V roce 1922 nastal průlom v oboru elektrochemie a to objevem polarografie. Díky pokusům, jako bylo měření koncentrace kyslíku v kapalinách za pomoci rtuťové kapající elektrody z roku 1935 a spotřeby kyslíku živými organismy z roku 1938, se ve 40. letech minulého století objevily práce využívající katodickou redukci kyslíku na ušlechtilých kovech. Přidáním membrány propouštějící plyny do elektrodového systému došlo k zásadním změnám u těchto elektrod. C. Clark Jr. byl první, kdo tento krok uskutečnil. V roce 1956, na zasedání Americké společnosti pro umělé orgány, byl jeho vynález po něm pojmenován jako tzv. „Clarkova elektroda“ a tentýž rok Clark publikoval článek o své kyslíkové elektrodě¹. Díky této inovaci získal spolehlivý měřicí systém vedoucí k sestrojení prvního biosenzoru, čímž se zapsal do historie. Jeho koncept byl představený v experimentu, kde byla tenká vrstva enzymu glukosaoxidasy (GOX) zachycená na Clarkově kyslíkové elektrodě za použití dialyzační membrány². Tento systém byl později nazvaný enzymovou elektrodou². Clarkovy teorie a nápady se staly reálně využívané a komerčně dostupné od roku 1975 a to díky jeho glukosovému analyzátoru založenému na amperometrické detekci peroxidu vodíku³. Do roku 1977 se termín biosenzor nepoužíval, tento termín zavedl až Karl Cammann, do té doby se mluvílo jen o enzymových elektrodách nebo biokatalytických membránových elektrodách⁴. Termín optický biosenzor zavedli Lubbers a Opitz, kteří v roce 1975 popsali ethanolový senzor z optického vlákna, na jehož povrchu byla imobilizovaná alkoholoxidasu spolu s kyslíkovým indikátorem na konci tohoto optického vlákna⁵. Dalším milníkem v rozvoji biosenzorů byla myšlenka vytvořit imunosenzor (imunochemický biosenzor využívající protilátky), která se začala rozvíjet koncem 70. let. Na počátku současných komerčních úspěchů afinitních biosenzorů byla práce Liedberga, který navrhl sledování afinitních interakcí v reálném čase pomocí rezonance povrchových plasmonů ve vrstvě kovu nanosené na optickém rozhraní⁶. V roce 1983 byl sestrojen první analyzátor využívající povrchovou plasmonovou rezonanci (SPR, z angl. surface plasmon resonance) a již v roce 1990 byl komerčně dostupný analytický SPR systém od firmy Pharmacia BIAcore.

2. Definice, charakteristika

2.1. Biosenzor

Biosenzor je podle doporučení IUPAC popsán jako „zařízení, které využívá specifické biochemické reakce zprostředkované izolovanými enzymy, imunosystémy, tkáněmi, organelami nebo celými buňkami pro detekci chemických sloučenin, obvykle měřením elektrických, tepelných nebo optických signálů“⁷. Jinými slovy, biosenzor je analytický systém reagující na konkrétní analyt, který obsahuje biorozpoznávací složku a převodník, což umožňuje sledovat analyty pomocí fyzikálních detektorů. Biosenzory slouží na kvantitativní stanovení nebo kvalitativní detekci a identifikaci analytu. Skládají se z bioreakční vrstvy (bioreceptoru), převodníku (angl. transducer) včetně dnes obvyklé elektronické jednotky a výstupního signálu (obr. 1). Většina biosenzorů pracuje v „label-free“ modu, to znamená že analyt není potřebné značit značkou, umožňující jeho detekci, ale deteguje se signál vzniklý přímou interakcí analytu a biorozpoznávací vrstvy.

2.2. Využití biosenzorů v praxi

Využití biosenzorů v běžné praxi je poměrně rozšířené, setkáváme se s nimi ve farmakologii, medicíně, zemědělství, potravinářství, vojenství, biotechnologii i v ekologii a monitoringu životního prostředí. Jejich využití je však částečně omezené, není obvyklé měření ve sterilních podmínkách, také je limitováno rozsahem koncentrace analytu a např. při měření s enzymy se často liší optimální provozní pH enzymu od pH prostředí⁸. Je-li signál biosenzoru příliš nízký, existuje několik strategií pro jeho zvýšení např. použitím nanočástic. Chceme-li získat kvalitnější resp. citlivější optický signál, použijeme nanomateriály s jedinečnými optickými a elektrickými vlastnostmi. Typickým příkladem je použití uhlíkových nanomateriálů, které jsou používány jako nosiče signalizačních molekul, které zahrnují aktivní molekuly, optické molekuly s fluorescencí a s ultrafialovou nebo infračervenou absorpcí.

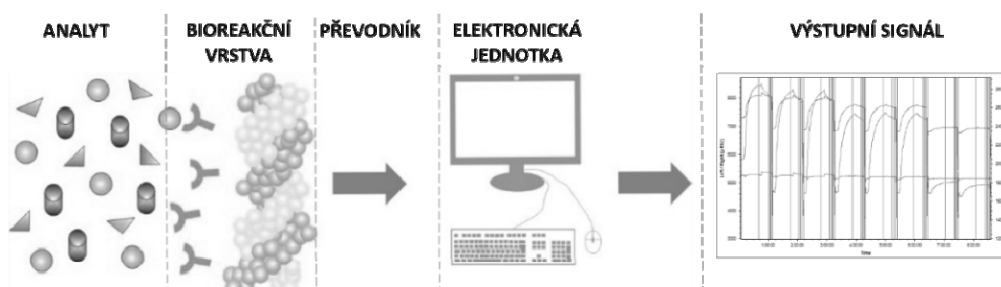
Biosenzory také můžeme využít k vysvětlení biofyzikálních aspektů interakce biomolekul pro lepší pochopení biologických procesů.

2.3. Biočip

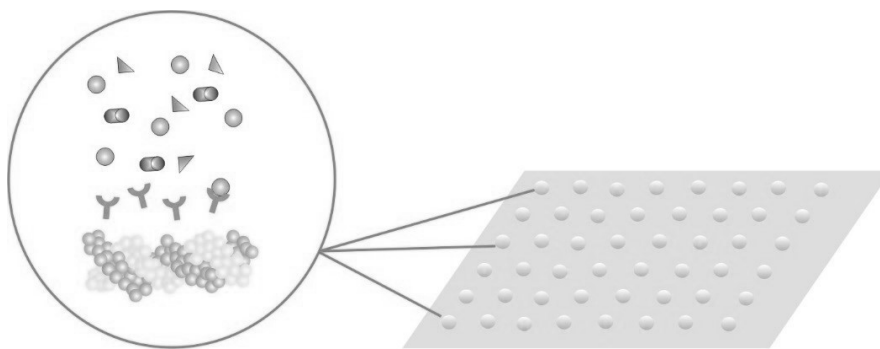
Biočip je podle doporučení IUPAC z roku 1992 definován jako „integrováný obvod, jehož elektrické a logické funkce se provádí pomocí vhodně uzpůsobených proteinových molekul“⁷. Doporučení IUPAC však plně neodpovídá aktuálnímu stavu, jelikož v současnosti se termín biočip používá už v jiné, širší souvislosti, což lépe vystihuje definice biočipu jako „sbírky miniaturních testovacích míst (microarray), uspořádaných na pevném substrátu, které umožňují simultánní provedení velkého množství testů, s cílem dosáhnout vyšší kapacity a rychlosti“⁹. Biočip se tak dá popsat jako soubor miniaturních zkušebních míst, jako „pole miniaturizovaných biosenzorů“, které jsou uspořádány na pevném povrchu (obr. 2). Umožňují tak paralelní měření mnoha vzorků, za stejných laboratorních podmínek a za relativně krátký čas. Kromě genomických aplikací se biočipy často používají v toxikologii, v biochemickém, biologickém a v biomedicinském výzkumu. Používané jsou např. k rychlé detekci toxických látek, které mohou být součástí biologických zbraní⁹. První generaci biočipu sestrojil a použil ve své práci Fred Sanger a Walter Gilbert, kteří byli oceněni Nobelovou cenou v roce 1980 za průkopnický přístup v DNA sekvenování¹⁰. Na rozdíl od biosenzorů, většina biočipových zařízení využívá vzorky značené vhodnou značkou, např. fluorescenční, kdy se deteguje signál (často optický) produkováný touto značkou.

3. Glykosylace a její význam

Glykosylace je nejčastější posttranslační modifikace proteinů. Jde o složitý proces, při němž dochází ke kovalentnímu navázání oligosacharidového řetězce na jinou molekulu, nejčastěji protein, ale též např. na lipid. Glykosylace může změnit vlastnost biomolekuly, např.



Obr. 1. Princip biosenzoru



Obr. 2. Princip biočipu

antigenní. Má velký vliv na strukturu a funkci některých proteinů. Glykany vázané na proteiny se účastní mnoha fyziologických procesů, například při regulaci signalizační kaskády, adhezi buněk a diferenciaci. Glykosylace je nezbytná pro život a i malé změny mohou narušit biologické dráhy. Změny v glykosylaci jsou často doprovázeny i patologickými projevy, mezi které patří i invazivita nádoru a tvorba metastáz¹¹. Geneticky vedené změny glykosylace jsou důvodem závažných onemocnění. Chorobné stavy související se změnou glykosylací jsou různorodé a u nádorových onemocnění zahrnují např. neurologické poruchy, svalovou dystrofii, nádorová onemocnění, imunitní nedostatky a kosterní abnormality.

Glykosylace proteinů se rozděluje na dva základní typy, a to na *N*-glykosylaci a *O*-glykosylaci. Při *N*-glykosylaci jsou sacharidy vázány přes *N*-acetyl- β -D-glukosamin na amidový dusík v L-asparaginu. Pro tento typ glykosylace musí být na proteinu přítomná signální sekvence Asn-Xxx-Ser/Thr, kde Xxx může být jakákoliv aminokyselina s výjimkou prolinu a kyseliny asparagové. Při *O*-glykosylaci se glykany váží na hydroxylovou skupinu L-serinu nebo L-threoninu, a to přes *N*-acetyl- α -D-galaktosamin. Na základě současných vědomostí pro *O*-glykosylaci neexistuje žádná signální sekvence¹².

Glykosylace proteinů má čtyři typy specifčnosti: (1) specifčnost druhovou, kde můžeme pozorovat odlišnosti mezi analogickými proteiny, jako jsou lidské či jiné savčí; (2) specifčnost tkáňovou, kde se např. glykosylační typ ledvinových glykoproteinů liší od typu charakteristického pro pojivovou tkáň; (3) specifčnost buněčnou, jež je dána vlastnostmi a funkcí určité buňky; a (4) specifčnost proteinovou, kdy jsou proteiny produkovány např. stejnou buněčnou linií za stejných kultivačních podmínek, ale mají různou glykosylaci.

4. Lektiny

Lektiny jsou skupina proteinů vázající cukry, s vysokou specificitou k daným glykanovým strukturám. O lektinech se někdy tvrdí, že jsou neimunitního původu

a nemají enzymatickou aktivitu, což není přesné, protože byly objeveny i lektiny s enzymatickou odpovědí, tzv. lektýmy¹³, jakož i lektiny tvořené v makrofázích vykazující imunitní odpověď¹⁴. Lektiny dokáží rozpoznat a navázat cukry ve volném nebo vázaném stavu na glykoproteiny či glykolipidy. Ve své struktuře mají obvykle dvě a více vazebných míst pro sacharidy. Lektiny můžeme rozdělit do několika skupin podle jejich monosacharidového rozpoznávání sacharidových struktur, které jsou například součástí virů, jsou na povrchu buněk živočichů, v glykokonjugátech a na erythrocytech. Takto je rozdělujeme do skupin dle jejich preference k mannose, fukose, *N*-acetylglukosaminu, galaktose/*N*-acetylgalaktosaminu nebo *N*-acetylneuraminové kyselině (kys. sialové). Dále můžeme lektiny rozdělit do skupin podle jejich výskytu v přírodě. Jako první byly lektiny objeveny v rostlinách a byly pojmenovány aglutininy pro jejich vlastnost aglutinovat erythrocyty, patří sem např. *Ricinus communis* aglutinin (RCA) a „Wheat germ agglutinin“ (WGA). Kromě rostlin je najdeme i v říši živočišné, v houbách a nebo v bakteriích. Lektiny nemůžeme považovat za katalyzátory chemických reakcí, ale účastní se dějů, ve kterých je specifické rozpoznávání.

4.1. Rostlinné lektiny

Tato skupina lektinů byla objevena jako první a také patří k největší a nejlépe prostudované skupině lektinů. Jde o unikátní proteiny a glykoproteiny se silnou biologickou aktivitou. Nejvíce prostudovaná skupina rostlinných lektinů byla izolována z *Legume* neboli luštěnin. Skládají se ze dvou nebo čtyř stejných podjednotek a patří mezi Ca^{2+} a Mn^{2+} dependentní lektiny. Lektiny z rostlinné říše najdeme v obilninách, fazolích, čočce, sóje, houbách, rýži, rajčatech, bramborech, hlízách dalších rostlin, dále v květech i oddencích řady rostlin¹⁵.

4.2. Živočišné lektiny

Živočišné lektiny jsou komplexní oligosacharidové struktury, které se nacházejí na povrchu buněk. Mohou se

vázat na extracelulární nebo intracelulární glykoproteiny. Tyto oligosacharidy mohou sloužit k zprostředkování transportu glykokonjugátu na povrch buněk nebo slouží jako rozpoznávací markery při interakci buňka-buňka nebo buňka-matrice.

Živočišné lektiny můžeme rozdělit do dvou skupin, a to na skupinu intracelulární a extracelulární, podle místa, kde lektiny fungují. Mezi intracelulární lektiny patří calnexin, M-tyt (člen glykosid hydrolas, který úzce souvisí s α -mannosidasou na endoplasmatickém retikulu), L-tyt (proteiny vážící glykany z jiných eukaryotních organismů) a P-tyt (nachází se v lumenálních oddílech sekreční dráhy z endoplasmatického retikula do Golgiho aparátu). K extracelulárním lektinům patří například C-tyt (má požadavek na přítomnost vápníku pro svou vazbu), R-tyt (obsahuje sacharidy rozpoznávající doménu, tzv. CRD – Carbohydrate Recognition Domain, strukturálně podobnou ricinu), S-tyt/galektiny a I-tyt/sigleky (to jsou glykanové vazebné proteiny patřící do imunoglobulinové skupiny proteinů). Nedávné výzkumy poukázali na existenci dalších skupin živočišných lektinů a to F-box, ficoliny, F-tyt, intelektiny a jiné¹⁶.

4.3. Houbové lektiny

Tyto lektiny jsou ve většině případech tvořeny dvěma nebo čtyřmi podjednotkami, které mohou být i nemusí být identické. Několik lektinů z této skupiny se odlišuje od ostatních, spojením svých podjednotek za pomoci disulfidické vazby, kdežto ostatní jsou spojeny nekovalentními vazbami. Velikost podílu glykosylace se v houbových lektinech hodně odlišuje. U některých z lektinů nebylo nalezeno žádné a nebo jen malé množství sacharidů, zatímco u jiných je tomu právě naopak¹⁷.

4.4. Bakteriální lektiny

Funkce lektinů ještě není zcela objasněna. U rostlinných lektinů víme, že se mohou vyskytovat ve všech částech rostliny. Mohou být zapojeny do její ochrany před nežádoucí infekcí, při inhibici růstu hub obsahující polysacharid chitin v buněčné stěně. U živočišných lektinů víme, že jsou zapojeny v mnoha biologických procesech, jako je přenos a odstranění glykoproteinu, adheze nebo imunitní odpověď. U bakteriálních lektinů je důležitá jejich funkce při patogenním rozpoznávání povrchu hostitelské buňky a tím je umožněna její adheze, což je první krok k vývoji infekce v hostitelském organismu.

4.6. Využití lektinů

Využití lektinů je nezměrné, můžeme se s nimi setkat v medicíně při diagnostice a následné terapii. Využívá se zde skutečnosti, že na povrchu prakticky každé buňky se nachází sacharidy, které významně regulují a ovlivňují proteinové interakce, u kterých lektiny hrají významnou roli. To je též důvod, proč se v poslední době na studium lektinů obrací velká pozornost. Lektiny mají velkou škálu

využití a nejen v biologických oblastech (buněčná identifikace, separace, detekce, izolace, mapování neurálních drah mitogenní stimulace lymfocyty). Práce s lektiny se využívá i při cíleném transportu léčiv v organismu. Principem je odlišná afinita lektinů k určitým tkáním. Tato metoda by mohla v budoucnu zajistit nejen vyhledání nádoru, ale i následnou terapii s využitím toxického efektu lektinů. Dnes se již některé lektiny využívají jako nosiče pro poskytování chemoterapie¹⁹. Byly také navrženy jako jedny z nadějných látek proti hmyzím škůdcům a byly použity u plodin jako je pšenice, rýže, tabák nebo brambory. Tento postup by mohl být časem aplikován jako součást integrované strategie ochrany proti škůdcům, která zajišťuje částečné nebo úplné zastavení vývoje hmyzu a nebo úmrtí hmyzu²⁰.

V bioanalytické chemii se využití lektinů rozvíjí dvěma směry. Jeden směr se zabývá charakterizací lektinové molekuly, sacharidovou vazebnou specifitou a biologickou rolí těchto lektinů. Druhý je výzkum, jenž je zaměřen na využití lektinů jako nástrojů určených na charakterizaci, identifikaci, izolaci a dokonce na detailní studium glykanů či jejich konjugátů s lipidy a proteiny, kde se lektiny jako biorozpoznávající elementy kombinují s vícerymi analytickými metodami. Mezi používané techniky tu patří např. lektinová afinitní chromatografie (LAC), lektinový blot a lektinové biosenzory a biočipy.

5. Biosenzory a biočipy využívající lektiny

Lektiny se úspěšně využívají při sestřování biosenzorů a biočipů určených pro sledování interakcí např. typu protein-protein a protein-sacharid. Rovněž se využívají pro sledování glykosylačních změn proteinů či slouží k studiu biologických pochodů v těle, kde jakákoliv změna vede ke změnám fyziologického stavu a následnému rozvoji onemocnění. Pro tyto studie jsou nejčastěji využívané následující platformy a převodníky pro lektinové biosenzory a biočipy: microarray s fluorescenční detekcí, povrchová plasmonová rezonance (SPR), elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) a křemenné mikrováhy (QCM), ze kterých poslední tři měří v tzv. „label-free“ módu.

Lektinová/glykanová microarray je nová platforma pro glykanovou analýzu. Na rozdíl od jiných běžných metod, např. kapalínové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, umožňuje rychlé a vysoce citlivé profilování komplexních glykanů detegující nízké koncentrace glykoproteinů, a proto je vhodná ke glykoproteinovému testování, tzv. skríningu, jelikož se jedná o „high-throughput“ metodu²¹. Při měření microarray technikou se používá jako nosný materiál většinou sklo. Skleněný povrch je obvykle modifikovaný různými reaktivními molekulami (např. aldehydové nebo epoxidové skupiny), na které jsou biomolekuly imobilizovány. Tyto biomolekuly jsou vytištěné na povrch pomocí microarray jehly. Formát microarray sklíčka odpovídá velikosti standardního mikroskopického sklíčka. Dalším krokem je označení biomolekul fluorescenčními barvami. Po tomto kroku následuje detekce,

kteřá je provedena laserovým skenováním pro specifickou vlnovou délku podle použitého fluorescenčního barviva. Intenzita fluorescence je měřena pro každý bod na mikročipu a následně vyhodnocena. Intenzita generovaného signálu je závislá na množství navázaných molekul²². Její velkou výhodou je rychlé zobrazení obrovského množství vzorků. Touto metodou můžeme sledovat nejen interakci mezi lektiny a sacharidy, ale i charakterizovat nové vazby mezi proteiny a sacharidy, také odhadovat enzymatické aktivity sacharidů a stanovovat enzymatické specifity^{23,24}. Touto technikou je možné sledovat interakci sacharid-protilátka, detegovat bakteriální a virové patogeny, studovat adhezi mechanismu bakteriální buňky na povrchu sacharidů. Tato technika je také využívána pro studium biologických procesů a jejich následné použití pro lékařskou diagnostiku²⁵. Lektinová microarray se využívá i pro studium samotné glykosylace, glykoprofilaci vzorků a může poskytovat informace týkající se struktury glykanů a jejich funkcí²⁶. Každý lektin má svou vazebnou specifitu, to znamená že se k danému glykoproteinu váže rozdílnou vazbou. Glykanová microarray, při které slouží jako bioreceptory imobilizované glykany nebo glykokonjugáty, které jsou vtlačeny na povrch čipu, slouží pro screening proteinů vázajících glykany a umožňuje tak sledování glykanové specifity lektinů anebo i virů²⁷.

Elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS) je velmi perspektivní technikou pro výzkum objemových a mezifázových elektrických vlastností různých druhů primárně nekapalných materiálů. Kromě materiálově-technologických aplikací jako např. kontroly baterií, polovodičů, technologie tenkých filmů, monitoringu koroze atd. našla tato metoda významné uplatnění při vývoji bioanalytických sensorových systémů. Velkou výhodou této metody je vysoká citlivost a možnost měřit až v atomolárních koncentracích²⁸. EIS je metoda založená na perturbaci elektrochemického systému napětíovým signálem sinusového tvaru o malé amplitudě a následném měření komplexní impedance v závislosti na frekvenci (10^6 – 10^{-6} Hz), což dovoluje postihnout charakter nejen rychlých elektrodoových dějů (přenos náboje), ale i těch pomalých (difuzní děje). Podmínkou správného měření je zvolení takové amplitudy, aby odezva systému zůstala lineární, tj. aby nedocházelo k nevratným změnám na povrchu sledovaného objektu. Volba amplitudy závisí na charakteru studovaného systému, správný výběr představuje kompromis mezi snahou minimalizovat šum v impedanční odezvě (použitím vysoké amplitudy) a snahou minimalizovat nelineární odezvu (užitím malé amplitudy). Tato technika byla využita např. pro sledování koncentrace glykoproteinů fetuinu, asialofetuinu a oxidovaného asialofetuinu, přičemž odezva byla lineární v rozsahu sedmi řádů a dosažená mez stanovení byla v atomolárních koncentracích²⁹.

Technika QCM (quartz crystal microbalance) neboli technika křemenných mikrovah je metoda, při které se měří hmotnost na jednotku plochy a to změnou frekvence rezonance na křemenném krystalu rezonátoru. Měření v kapalině se využívá pro stanovení afinity molekul

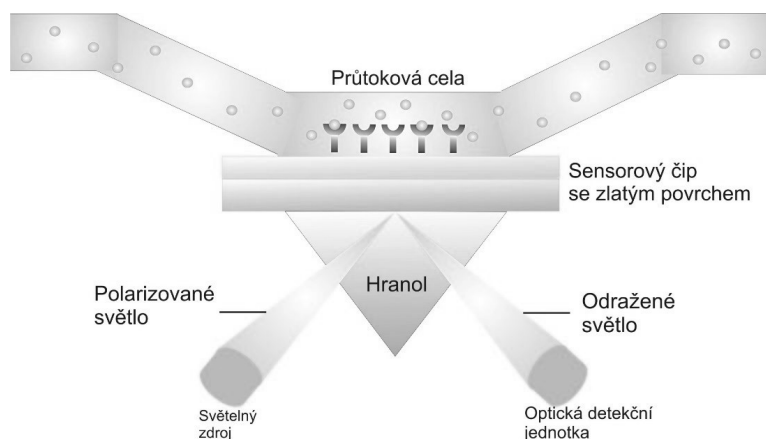
(hlavně proteinů) na povrchu s funkčními rozpoznávacími místy. Pomocí QCM biosenzoru byl vyvinut nový přístup ke studiu molekulárních interakcí na povrchu savčích buněk. Při studiu buněčných linií epidermálního karcinomu a adenokarcinomu prsu byly tyto buněčné linie imobilizovány na polystyrenem potažených křemenných krystalech. Na těchto buněčných liniích byla sledována jejich vazba a disociace s lektiny Concanavalin A (ConA), *Dolichos biflorus* aglutinin (DBA), Peanut aglutinin (PNA) a *Ulex europaeus* aglutinin (UEA-I) v reálném čase. Toto studium umožnilo sledování glykosylačních změn u probíhající rakoviny, od počáteční fáze až k terminální fázi rakoviny³⁰.

Povrchová plasmonová rezonance (SPR) je mimo jiné metoda umožňující optické sledování biospecifických interakcí, které probíhají na povrchu biočipu mezi imobilizovaným ligandem resp. ligandy a protékajícím volným analytem resp. analyty. V obvyklém komerčním uspořádání je zde sledován jev, kdy polarizované světlo v podmínkách úplného vnitřního odrazu zasahuje do elektricky vodivé zlaté nanovrstvy na čipu na rozhraní mezi médii s odlišným indexem lomu. Deteguje se intenzita odraženého světla, k jejímuž poklesu dochází při splnění rezonanční podmínky závislé kromě jiného na dielektrických vlastnostech kapalného mezifázi přiléhajícího k plasmonické zlaté nanovrstvě. V této přehledové práci jsme se zaměřili právě na lektinové SPR biočipy a biosenzory, které umožňují „label-free“ analýzu v reálném čase a nevyžadují žádnou chemickou úpravu vzorků.

6. Lektinová SPR

6.1. Princip SPR

SPR je analytická metoda, kde se během měření sleduje zářivý tok (intenzita) odraženého monochromatického záření v závislosti na úhlu odrazu a nebo se sleduje intenzita odrazu pro záření různých vlnových délek při konstantním úhlu v závislosti na vlnové délce. Tato metoda umožňuje měření v tzv. „label free“ formátě nebo-li měření bez nutnosti značení. Během měření se v reálném čase sleduje interakce mezi vstříkovaným analytem a biomolekulou imobilizovanou na povrchu SPR čipu. SPR je vysoce citlivá na změnu hmotnosti na povrchu čipu, ke které dochází při navázání analytu na imobilizovanou biomolekulu, která způsobí posun v úhlu rezonance, tj. úhlu, při kterém je zeslabeno odražené záření v důsledku excitace povrchového plasmonu. Resonanční podmínky jsou také závislé na komplexním indexu lomu adhezujícího „kapalného“ prostředí, což je veličina, která se mění při biospecifickém zachycení analytu. Záření je polarizováno, neboť pouze vlny kolmé na rovinu povrchu (tzv. p-polarizace) mohou vyvolat SPR. Tento jev je důsledkem vzniku rezonance mezi frekvencí záření a frekvencí kolektivních oscilací povrchových elektronů v nanovrstvě kovu (vznik tzv. povrchových plazmonů) na rozhraní hranol (sklo) / kov (Au) / dielektrikum (voda, pufr) za podmínek



Obr. 3. Princip měření povrchové plasmonové rezonance v Kretschmannově uspořádání

úplného odrazu světla^{31–34}. Povrchové plazmony jsou v podstatě hromadné excitace oscilací elektronů vázaných na rozhraní mezi vodičem a izolantem. Při dopadu lineárně p-polarizovaného paprsku na rozhraní dvou prostředí s rozdílnými indexy lomu vzniká povrchová (evanescentní) vlna. Je nutné, aby úhel dopadu paprsku na rozhraní mezi optickým hranolem a přímo kovem nebo ultratenkou dielektrickou vrstvou byl větší než tzv. mezní úhel dopadu, pak dochází k totálnímu odrazu a vzniku evanescentní vlny (tj. nesmí docházet k lomu záření). Jestliže je na povrch senzoru navázána biomolekula, dojde ke změně indexu lomu tohoto prostředí a obvykle měřením změny úhlu, při němž dochází ke vzniku SPR jevu, lze vazbu této látky detegovat. Při bioanalytickém SPR experimentu je vždy jeden z vazebních partnerů imobilizován na povrchu optického senzoru (ligand) a druhý protéká okolo rozpuštěný v pufru (analyt) (viz obr. 3). Tvorba jejich komplexu, stejně jako jeho disociace, je doprovázena změnou indexu lomu, resp. změnou rezonančního úhlu, která je přímo úměrná množství vázaného analytu. Index lomu při této metodě je ovšem též velmi citlivý na teplotu a na hustotu daného média^{35,36}.

Povrchovou plasmonovou rezonanci lze v rámci bioanalytických aplikací využít v mnoha oblastech od klinické oblasti, přes stanovení biochemických markerů, léčiv či drog, až po monitoring životního prostředí, v potravinářství nebo i ve vojenství k detekci virů, bakterií nebo toxinů. Jde tedy o vysoce citlivou metodu, která se vyznačuje rychlou detekcí a kvantifikací. Pro tuto metodu není nutné značení jednoho z reakčních členů a stanovení lze provádět v reálném čase. Pro přípravu bioanalytického SPR čipu je možné využít dva způsoby. Buď lze SPR čip připravit způsobem, kdy se ligand váže kovalentní vazbou ke karboxylovým skupinám zakotveným na povrchu čipu, a nebo je možné nekovalentní zachycení ligandu na molekulu kovalentně imobilizovanou na povrchu čipu³⁷. SPR byla úspěšně použita například pro detekci leukemických markerů³⁸, proteinových biomarkerů rakoviny³⁹ a prosta-

tického antigenu v séru⁴⁰, bakterií *Neisseria meningitidis*⁴¹, také pro kontrolu léčiv⁴², kvasinek *Candida albicans* způsobující infekce dutin⁴³ a viru hepatitidy B⁴⁴.

6.2. Aplikace SPR s využitím lektinů

SPR využívající lektiny byla vyvinuta pro snadnou a rychlou detekci *E. coli* 0157. Při charakterizaci interakce lektinů se sacharidovými komponentami z bakteriální buňky bylo pro detekci použito celkem pět typů lektinů (izolovaných z *Triticum*, *Canavalia ensiformis*, *Ulex europaeus*, *Arachis hypogea* a *Maackia amurensis*). Tyto typy detekce se plánují využívat při kontrole bezpečnosti potravin⁴⁵. Lektinová SPR byla aplikována i při nepřímém stanovení *Bacillus anthracis* detegováním ochranného antigenu (PA)⁴⁶. Metoda byla využita také pro charakterizaci viru *Herpes simplex* s pomocí lektinů⁴⁷. SPR technika byla použita pro výzkum HIV a viru Dengue pomocí lektinů typu C⁴⁸. Dále se SPR s pomocí lektinů využila pro výzkum nádorových onemocnění, jako jsou kolorektální karcinom s využitím HPA (*Helix pomatia*)⁴⁹ a rakovina prostaty s pomocí lektinů SNA, AAL (*Aleuria aurantia lectin*) a PHA-L⁵⁰. Leukemické buňky byly sledovány pomocí lektinů ALA (*Artocarpus lakoocha* agglutinin), AHL (*Artocarpus hirsuta* lectin) a MPA (*Maclura pomifera* agglutinin)⁵¹. Penezic použil zlatý SPR čip potažený grafenem, kde sledoval interakci mannosy s lektiny z *Lens culinaris* (LCA) a *Triticum vulgare* (TVA)⁵². Tento pokus poukázal na rozdílnou vazebnou specifitu mezi jednotlivými lektiny a zatímco LCA se specificky vázal na mannosy-pyranosidové jednotky, tak TVA měl afinitu k N-acetylglukosaminu a ke zbytkům kyseliny sialové⁵². Interakce lektin – glykoprotein byly sledovány pro soubor rostlinných lektinů vázajících mannosu (ConA, LCA a PSA) a různých glykoproteinů obsahujících mannosu, přičemž zjištěné hodnoty disociačních konstant zkoumaných interakcí byly korelované se známou strukturou glykoproteinů a hustotou jejich imobilizace na čipu⁵³. SPR

technika byla využita i při studiu DC-SIGN (C-ty) lektinového receptoru na antigen reprezentující dendritické buňky, které hrají důležitou roli u některých virových infekcí jako je např. HIV nebo vir Dengue⁴⁹. Tato metoda se využila také pro identifikaci galektinu-1 a galektinu-3 jako potencionálních vazebných partnerů faktoru VIII, také známého jako anti-hemophilický faktor (AHF)⁵⁴ nebo při studiu strukturálních a funkčních vztahů u rekombinantních proteinů HBHA typů C, S⁵⁵ a v mnoha dalších studiích.

6.3. SPR imaging

SPR imaging (SPRi) je zobrazovací SPR technika pro měření interakcí mezi neoznačenými biologickými molekulami, kde na rozdíl od klasické SPR je možné sledovat více interakcí zároveň⁵⁶. Jako monokanálový detektor se často používají CCD kamery, což umožňuje vizualizaci celého biočipu. SPRi technika má všechny výhody SPR a navíc umožňuje simultánní stanovení velkého počtu biointerakcí na jednom čipu a tak umožňuje paralelní stanovení několika různých analytů současně. Dá se říci, že SPRi technologie posouvá SPR analýzu o krok dál. SPRi čip se často připravuje pomocí microarray spoterů, obdobně jako microarray biočipy, což obvykle umožňuje použití menšího množství vzorku než klasická SPR, kdy je však důležité určit si počet a množství látek, které se budou nanášet na povrch plasmonického čipu. Tyto vlastnosti činí SPRi velmi slibnou multiplexní technologií pro bioanalytickou chemii s cílem simultánního sledování většího množství interakcí typu protilátka-antigen, enzym-substrát, DNA hybridizace, protein-DNA nebo také interakcí protein-protein⁵⁷. SPRi technika se taktéž využívá pro aplikace v glykomicce. Proběhly studie, které byly zaměřeny na sledování sacharidů vázající proteiny/lektiny, které byly charakterizovány právě pomocí SPRi. Jejich zjištěná biologická aktivita byla korelována s jejich chemickou strukturou, která byla zjištěna metodou TOF-SIMS (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry – hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů). Protein vázající lektin Con A byl použit k testování biologicky dostupných glykanů. Con A má totiž silnou afinitu k neredukující α -mannose a α -glukose⁵⁸. Tato technika má obrovské výhody při sledování více biologických interakcí ve formátu multiplexního pole. V roce 2009 Linman a spol. sestavili sacharidový mikročip pro analýzu lektino-sacharidových interakcí. Byl zde sledován lektin *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) na čtyřech různých funkčních površích, a díky tomu byla sledována struktura terminální kyseliny sialové spolu s její vazbou. Tato studie poukázala i na možnosti využití cílených povrchových chemických reakcí pro modifikaci povrchu biočipu, což umožňuje optimalizaci analýzy, potlačení nespecifických interakcí a tím zlepšení citlivosti a meze stanovení⁵⁹.

7. Závěr

Pomocí lektinových biočipů a biosenzorů můžeme sledovat a studovat glykosylaci. Změny glykosylace jsou doprovázeny změnami fyziologického stavu, což může být spojeno s některými druhy onemocnění jako jsou např. nádorová onemocnění, revmatoidní artritida, roztroušená skleróza, atd. V posledních letech se této problematice věnuje stále více odborníků a v dané problematice jsou zaznamenány značné pokroky. Tato práce je zaměřena na využití povrchové plasmonové rezonance (SPR) v kombinaci s lektinovými biosenzory a biočipy pro sledování glykosylace a její změny. Pomocí SPR se běžně detegují proteiny a studují interakce protein-protein a protein-léčivo. Lektinové SPR biočipy umožňují sledovat navíc i glykan(glykoprotein)-lektin(protein) interakce⁶⁰. Cennou výhodou SPR v porovnání s většinou jiných metod používaných pro tento účel je možnost provádět měření v reálném čase a bez nutnosti značení vzorků⁶¹. Na druhé straně, měření více vzorků je časově náročnější, což je možné překonat pomocí techniky SPR zobrazování (SPRi), která umožňuje simultánní měření více vzorků⁶². Praktické aplikace lektinových SPR biočipů a biosenzorů jsou nejen v biologii a biomedicině při výzkumu a diagnostice chorob a detekci patogenních mikroorganismů, ale i při monitoringu životního prostředí, v potravinářství nebo i ve vojenství při detekci otravných látek založených na glykoproteinových toxinech⁶³.

Tato publikace byla podpořena NPRP grantem # 6-381-1-078 z Qatar National Research Fund (člen Qatar Foundation). Prohlášení zde uvedená jsou výhradně odpovědností autorů. This publication was made possible by NPRP grant # 6-381-1-078 from the Qatar National Research Fund (a member of Qatar Foundation). The statements made herein are solely the responsibility of the authors.

LITERATURA

1. Clark L. Jr.: Am. Soc. Artif. Intern. Organs 2, 41 (1956).
2. Clark L. Jr., Lyons C.: N. Y. Acad. Sci., Ann. 102, 29 (1962).
3. Newman J. D., Turner A. P. F.: Biosens. Bioelectron. 20, 2435 (2005).
4. Cammann K.: Fresenius' Z. Anal. Chem. 287, 1 (1977).
5. Lubbers D. W., Opitz N.: Zeitschrift fur Naturforschung, Section C: Biosciences 30, 532 (1975).
6. Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I.: Sens. Actuators 4, 299 (1983).
7. Nagel B., Dellweg H., Gierasch L.M.: Pure Appl. Chem. 64, 143 (1992).
8. Uhrová H.: *Biosenzory, přednáška, VŠCHT*. <https://vscht.cz/ufmt/cs/pomucky/uhrovah/docs/Biofyzika/Biosenzory.pdf>, staženo srpen 2016.

9. <http://searchcio-midmarket.techtarget.com/definition/biochip>, staženo 29. červenec 2014.
10. Persidis A.: *Nat. Biotechnol.* 16, 981 (1998).
11. Reis A.C., Osorio H., Silva L., Gomes C., David L.: *J. Clin. Pathol.* 63, 322 (2010).
12. Katrlík J., Švitel J., Gemeiner P., Kožár T., Tkac J.: *Med. Res. Rev.* 30, 394 (2010).
13. Sharon N., Lis H.: *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 14, 53 (2003).
14. Underhill D. M., Iliiev I. D.: *Nat. Rev. Immunol.* 14, 405 (2014).
15. Gonzalez E. M., Priscecaruv V. I.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 425 (2005).
16. Varki A., Cummings R. D., Esko J. D., Freeze H. H., Stanley P., Bertozzi C. R., Hart G. W., Etzler M. E.: *Essentials of Glycobiology*, 2. vyd., Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2009.
17. Guillot J., Kónská G.: *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 203 (1970).
18. Sharon N.: *Biochem. Biophys. Acta* 1760, 527 (2006).
19. Singh H., Sarathi S. P.: *Int. J. Sci. Eng. Technol.* 3, 4 (2012).
20. Lam S. K., Ng T. B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 45 (2011).
21. Hirabayashi J., Yamada M., Kuno, Tateno H.: *Chem. Soc. Rev.* 42, 4443 (2013).
22. Pulverer W., Noehammer C., Vierlinger K., Weinhaeusel A.: Austrian Institute of Technology GmbH Health & Environment Department: Principles and application of microarray technology in Thyroid cancer research, 2012. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/33331.pdf>, staženo 5. listopadu 2014.
23. Carroll G. T., Wang D., Turro N. J., Koberstein J. T., Dill K., v knize: *Microarrays: Preparation, Microfluidics, Detection Methods, and Biological Applications*, str. 191. Springer Science + Business Media, New York 2009.
24. Fais M., Karamska R., Russell D. A., Field R. A.: *J. Cereal Sci.* 50, 306 (2009).
25. Ngundi M. M., Taitt C. R., McMurry S. A., Kahne D., Ligler F. S.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 1195 (2006).
26. Mahal L. K.: *Anticancer Agents Med. Chem.* 8, 37 (2008).
27. Song X., Heimbürg-Molinario J., Smith D. F., Cummings R. D.: *Methods Mol. Biol.* 800, 163 (2012).
28. Klukova L., Bertok T., Kasak P., Tkac J.: *Anal. Methods* 6, 4922 (2014).
29. Bertok T., Sediva A., Katrlík J., Gemeiner P., Mikula M., Noskoc M., Tkac J.: *Talanta* 108, 11(2013).
30. Pei Z., Saint-Guirons J., Käck C., Ingemarsson B., Aastrup T.: *Biosens. Bioelectron.* 35, 200 (2012).
31. Azarin A., Babaei F.: *Opt. Commun.* 289, 1 (2013).
32. Mansuripur M., Zakharian A. R., Moloney J. V.: *Opt. Photonics News* 18, 44 (2007).
33. Prnka T., Šperlink K.: *Bionanotechnologie, nanobio-technologie, nanomedicina*. Vyd. Repronis, Ostrava 2006.
34. Homola J.: *Chem. Rev.* 108, 456 (2008).
35. Barr E. S.: *Am. J. Phys.* 23, 623 (1955).
36. Roos H., Karlsson R., Nilshans H., Persson A.: *J. Mol. Recognit.* 11, 204 (1998).
37. Moriarty L.: Bio-Rad Laboratories, Inc., Alfred Nobel Drive, Hercules, protocol guide, 2000. http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5821.pdf, staženo 5. února 2014.
38. Maisonneuve M., Valsecchi C., Wang C., Brolo A. G., Meunier M.: *Biosens. Bioelectron.* 63, 80 (2014).
39. Piliarik M., Bockova M., Homola J.: *Biosens. Bioelectron.* 26, 1656 (2010).
40. Jiang Z. X., Qin Y., Peng Z., Chen S. H., Chen S., Deng C. Y., Xiang J.: *Biosens. Bioelectron.* 62, 268 (2014).
41. Kaur G., Paliwal A., Tomar M., Gupta V.: *Biosens. Bioelectron.* 78, 106 (2016).
42. Altintas Z., France B., Ortiz J. O., Tothill I. E.: *Sens. Actuators, B* 224, 726 (2016).
43. Yodmongkol S., Thaweboon S., Thaweboon B., Puttharugsa C., Sutapun B., Amarit R., Somboonkaew A., Srihirin T.: *Jpn. J. Appl. Phys.* 55, 203 (2016).
44. Xu H., Gu D. Y., He J. A., Shi L., Yao J. Y., Liu C. X., Zhao C. Z., Xu Y. Q., Jiang S. Y., Long J.: *Bio-Med. Mater. Eng.* 26, 2091 (2015).
45. Wang Y., Ye Z., Si C., Ying Y.: *Food Chem.* 136, 1303 (2013).
46. Ghosh N., Gupta G., Boopathi M., Pal V., Singh A. K., Gopalan N., Goel A. K.: *Indian J. Microbiol.* 53, 48 (2013).
47. Gopinath S. C., Hayashi K., Lee J. B., Kamori A., Dong C. X., Hayashi T., Kumar P. K.: *Anal. Chem.* 85, 10455 (2013).
48. Varga N., Sutkeviciute I., Ribeiro-Viana R., Berzi A., Ramdasi R., Daggetti A., Vettoretti G., Amara A., Clerici M., Rojo J., Fieschi F., Bernardi A.: *Biomaterials* 35, 4175 (2014).
49. Peiris D., Markiv A., Curley G. P., Dwek M. V.: *Biosens. Bioelectron.* 35, 160 (2012).
50. Kazuno S., Fujimura T., Arai T., Ueno T., Nagao K., Fujime M., Murayama K.: *Anal. Biochem.* 419, 241 (2011).
51. Chatterjee U., Bose P. P., Dey S., Singh T. P., Chatterjee B. P.: *Glycoconjugate J.* 25, 741 (2008).
52. Penezic A., Deokar G., Vignaud D., Pichonat E., Happy H., Subramanian P., Gasparović B., Boukherroub R., Szunerits S.: *Plasmonics* 9, 677 (2014).
53. Katrlík J., Škrabana R., Mislovičová D., Gemeiner P.: *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 382, 198 (2011).
54. Oh H. K., Lee J. M., Byun T. H., Park S. Y., Kim Y. H.: *Biotechnol. Prog.* 17, 1119 (2001).
55. Lefrancois L. H., Bodier C. C., Cochard T., Canepa S., Raze D., Lanotte P., Sevilla I. A., Stevenson K., Behr M. A., Loch C., Biet F.: *J. Bacteriol.* 195, 4844 (2013).
56. Šigutová R., Lesňák M., Kušnierová P., Švagera Z., Šafarčík K.: *FONS informační bulletin* 23, 7 (2013).

57. Steiner G.: *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 328 (2004).
58. Bolles K. M., Cheng F., Burk-Rafel J., Dubey M., Ratner D. M.: *Materials* 3, 3948 (2010).
59. Linman M. J., Yu H., Chen X., Cheng Q.: *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1, 1755, (2009).
60. Sota H., Lee R. T., Lee Y. C., Shinohara Y.: *Methods Enzymol.* 362, 330 (2003).
61. Wegner G. J., Wark A. W., Lee H. J., Codner E., Saeki T., Fang S. P., Corn R. M.: *Anal. Chem.* 76, 5677 (2004).
62. Pegah N. A., Nimet Y., April Z. G., Edgar D. G.: *Biosens. Bioelectron.* 74, 808 (2015).
63. Medina M. B.: *Food Test. Anal.* 3, 14 (1997).

A. Šedivá and J. Katrlík (*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*): **Determination of Glycosylation by Lectin Biochips and Biosensors Based on Surface Plasmon Resonance**

Lectin biochips and biosensors are used to detect and study the protein glycosylation. Glycosylation changes are accompanied by changes in physiological state, which may

be associated with certain types of diseases such as cancer, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, etc. In recent years, this issue has been attracting more and more scientists and enormous advances have been achieved in this field. This work is focused on the use of surface plasmon resonance (SPR) in combination with lectin biosensors and biochips enabling tracking glycosylation and its changes. SPR is commonly used to detect proteins and to study the protein-protein and protein-drug interactions. Lectin SPR biochips additionally allow us to detect the glycan (glycoprotein)-lectin (protein) interactions. The great advantage of SPR, as compared to most other methods used for this purpose, is the possibility of real-time and label-free measurements. On the other hand, the measurement of large number of samples is time consuming. This is possible to overcome by using the SPR imaging (SPRi) techniques allowing simultaneous measurement of several samples. Practical applications of the lectin SPR biosensors and biochips are not only in biology and biomedicine research and diagnosis of diseases and detection of pathogenic microorganisms, but also in environmental monitoring, food control and even in the military for the detection of substances based on glycoprotein toxins.