

MODIFIKACE BIOMAKROMOLEKUL KOMPLEXY ŠESTIMOCNÉHO OSMIA A ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ MODIFIKOVANÝCH PRODUKTŮ

MOJMÍR TREFULKA

Biofyzikální ústav, AV ČR, v.v.i., Královopolská 135,
612 65 Brno
tref@ibp.cz

Došlo 9.8.17, přijato 5.10.17.

Klíčová slova: značení šestimocným osmiem, biologicky významné molekuly, voltametrie, rtuťové a uhlíkové elektrody, sacharidy, nukleové kyseliny, glykoproteiny

Obsah

1. Úvod
2. Reakce sacharidů s komplexy Os(VI)L
3. Elektrochemie Os(VI)L modifikovaných sacharidů
 - 3.1. Voltametrie jednoduchých Os(VI)L modifikovaných sacharidů
 - 3.2. Modifikace glykanů a jejich voltametrická detekce přímo v glykoproteinech
4. Závěr

1. Úvod

Vodný roztok oxidu osmičelého je již dlouho používán v biologii na fixaci a barvení biologických preparátů. Oxid osmičelý proniká lehce buněčnými membránami a reaguje snadno s nukleovými kyselinami, nenasycenými lipidy i proteiny. Prvotními produkty reakce jsou sloučeniny šestimocného osmia, ty jsou však bez přítomnosti látek, které by je stabilizovaly, ve vodném prostředí nestálé, a podléhají dalším chemickým změnám. Ty vedou nakonec ke sloučeninám s nižším oxidačním stupněm osmia, např. k deposici tmavě zbarveného a ve vodě nerozpustného oxidu osmičitého (OsO_2) na hydrofilních stranách buněčných membrán¹.

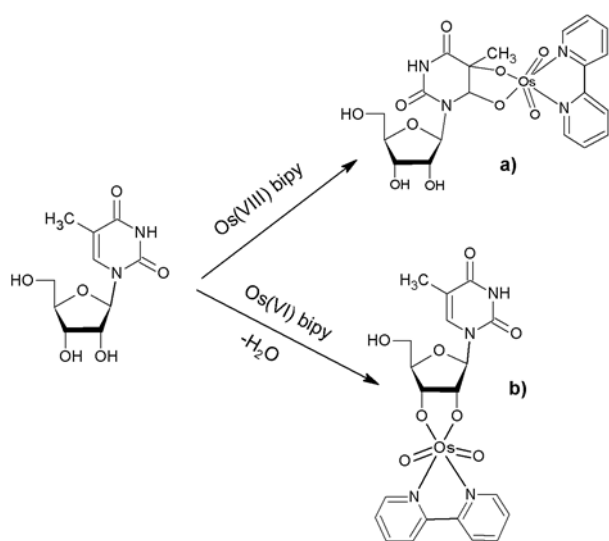
V 80. letech 20. století našel oxid osmičelý nové uplatnění při značení a výzkumu nukleových kyselin (NA)^{2–7}. Výhodou značek obsahujících osmium je jejich elektrochemická aktivita a možnost jejich přímého stanovení elektrochemickými metodami. Oxid osmičelý není při značení NA používán sám, ale v přítomnosti vhodného organického dusíkatého ligandu (L). Je to proto, že produkty vzniklé v přítomnosti organických dusíkatých ligandů jsou obvykle stálé i ve vodném prostředí, a lze je snadno identifikovat. První používané ligandy byly pyridin

(py) a 2,2'-bipyridin (bipy). Oxid osmičelý reaguje v přítomnosti těchto ligandů pouze s jednořetězcovou DNA (ssDNA), nebo dvouřetězcovou DNA (dsDNA), obsahující strukturální distorze, ale nereaguje s nepoškozenou dsDNA v B-formě^{2,5,8,9}. DNA modifikovaná Os(VIII)L je silně imunogenní a s její pomocí byly vytvořeny protilátky^{10,11}, které se osvědčily při analýze DNA v buňkách¹².

Oxid osmičelý a jeho komplexy s organickými dusíkatými ligandy je možno použít rovněž při značení a výzkumu peptidů a proteinů^{13–16}. Podstatou značení NA a proteinů je reakce ligandových komplexů OsO_4 [Os(VIII)L] s určitými dvojnými vazbami, v případě NA je to vazba v poloze 5,6 na thyminu a méně reaktivní vazba v poloze 5,6 na cytosinu nebo uracilu^{9,17}. V nepoškozené dsDNA jsou však tyto nukleové báze skryty uvnitř dvoušroubovice, a nejsou přístupné modifikačnímu činidlu. V případě proteinů je to dvojná vazba v poloze 2,3 na tryptofanu^{15,16}. Jiné dvojně vazby, např. u NA na purinových bázích, za podmínek značení nereagují. Na počátku 80. let minulého století stály lokální struktury DNA ve středu zájmu a byly hledány chemické sondy struktury DNA (viz přehled¹⁸). Jednou z prvních takových sond byl komplex Os(VIII)bipy, který umožňoval detekci lokálních struktur DNA jako např. segmentů levotočivé DNA^{19,20} nebo triplexů^{21,22} či vlásenek²³ na úrovni rozlišení jednotlivých nukleotidů *in vitro*⁵ i přímo v buňkách²⁴. Vedle metod elektroforetických a elektrochemické analýzy na HMDE (cit.^{2–4,8,25}) byly využívány i pevné amalgamové elektrody²⁶.

Kromě Os(VIII)L nabízí další možnost značení biomolekul použití ligandových komplexů šestimocného osmia [Os(VI)L]. Tento typ značení biomolekul je dosud méně prozkoumán. Výchozí látkou pro přípravu Os(VI)L je obvykle osmian draselný dihydrát, $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Tato látka je netěkavá a je komerčně dostupná. Výhodou značení Os(VI)L oproti Os(VIII)L je vyhnutí se manipulaci s těkavým a vysoce toxickým oxidem osmičelým.

Na rozdíl od Os(VIII)L, který reaguje s násobnými vazbami, reaguje Os(VI)L s dioly. Dle literatury reagují s Os(VI)L pouze 1,2-dioly (glykoly), a to alifatické, cyklické *cis*- a na šestičlenném a sedmičlenném kruhu i *trans*-1,2-dioly (cit.²⁷). Reakčními produkty jsou, stejně tak jako v případě reakce Os(VIII)L s dvojnou vazbou, ve vodném prostředí většinou stále ligandové osmát estery. Obr. 1 znázorňuje rozdílné reakce 5-methyluridinu (ribothymidinu), který obsahuje jak nukleovou bázi, tak 1,2-diolové uskupení, s komplexy Os(VIII)bipy a Os(VI)bipy. Ribothymidin reaguje s Os(VIII)bipy na pyrimidinové bázi, kdežto s Os(VI)bipy na diolovém uskupení²⁸. 1,2-Diolová uskupení obsahuje řada biologicky významných látek, jako jsou např. mono-, oligo- a polysacharidy, 3'-konce RNA a glykoproteiny. Zatímco v 80. letech se práce sou-



Obr. 1. Rozdílná reakce ribothymidinu s Os(VIII)bipy a Os(VI)bipy (převzato z práce²⁸ se svolením John Wiley and Sons)

středovala na DNA a RNA a o sacharidy byl poměrně malý zájem, v posledních desetiletích, zájem o sacharidy silně vzrůstá. Ukázalo se, že většina bílkovin savců jsou glykoproteiny^{29,30} a že glykosylace bílkovin hraje důležitou úlohu ve zdraví a nemoci. Biomarkery využívané v medicíně jsou často glykoproteiny a ukazuje se, že jejich specifita (např. specifita PSA biomarkeru rakoviny prostaty^{31,32}) může být zvýšena díky analýze jejich cukerných složek (glykanů). Jsou proto hledány jednoduché a levné metody, které by byly použitelné v diagnostice při analýze glykanů. Lze předpokládat, že chemická modifikace glykanů pomocí komplexů Os(VI)L, kombinovaná s elektrochemickou analýzou a imunoanalýzou, by mohla být v tomto směru užitečná.

V této práci jsou shrnuty poznatky o reaktivitě sacharidů s komplexy Os(VI)L a o elektrochemickém chování polysacharidů, glykoproteinů a glykanů modifikovaných Os(VI)L.

2. Reakce sacharidů s komplexy Os(VI)L

Sacharidy jsou polyhydroxysloučeniny obsahující obvykle 1,2-diolová uskupení a lze je modifikovat Os(VI)L. V případě nejběžnějšího šestičlenného pyranosového kruhu reagují *cis*-1,2-dioly i *trans*-1,2-dioly, jak dokládá úspěšná modifikace jak dextransu a amylosy, tak mannanu³³. U některých oligo- nebo polysacharidů může být modifikace některých 1,2-diolů ztížena nebo znemožněna sterickými vlivy. Například u α -1,4-glukanů [amylosa, (cyklo)dextriny], je modifikována nanejvýš každá druhá glukosová jednotka³⁴. Přehled některých ligandů (L), používaných při modifikacích Os(VI)L je uveden v tab. I. Nejpoužívanější z těchto ligandů jsou 2,2'-bipyridin (bipy), *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiamin (temed) a pyridin (py). Modifikace Os(VI)py probíhá velmi rychle, pyridin je však vázán labilně a snadno se vymění za jiný ligand. Proto bývá někdy výhodné použít při modifikaci sacharidů ligandovou výměnu, kdy se nejdříve modifikuje Os(VI)py a následně py vymění za jiný ligand^{35,36}.

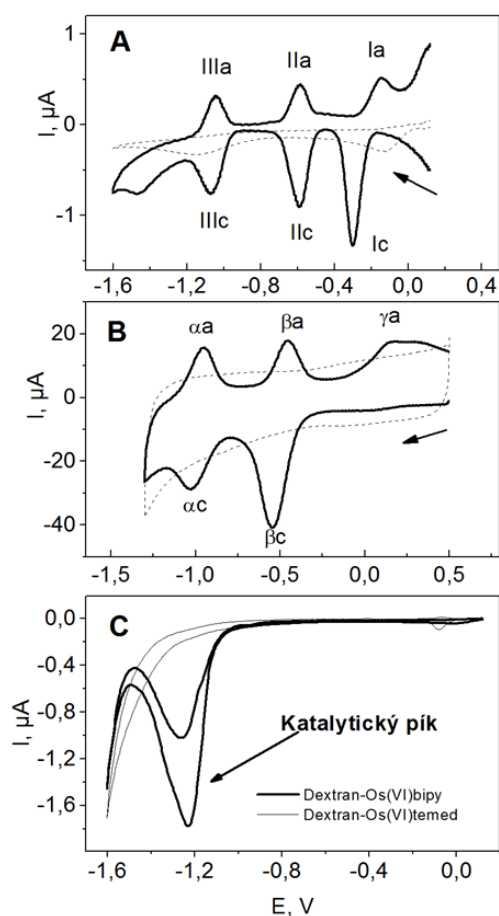
3. Elektrochemie Os(VI)L modifikovaných sacharidů

3.1. Voltametrie jednoduchých Os(VI)L modifikovaných sacharidů

Os(VI)L modifikované produkty jsou elektrochemicky aktivní, na rozdíl od např. nemodifikovaných jednoduchých sacharidů^{33,37}. Tyto modifikované sacharidy poskytují jednak redoxní píky, pozorovatelné např. na uhlíkových elektrodách (jako např. na elektrodě z pyrolytického grafitu, PGE) nebo rtuťových elektrodách (jako např. na visící rtuťové kapkové elektrodě, HMDE) (obr. 2), dále katalytický pík, který je pozorovatelný pouze v případě některých ligandů (tab. I) na HMDE, popř. na pevných amalgamových elektrodách (obr. 2C)^{33,38}. Redoxní píky se vyskytují obvykle ve třech párech, označovaných na HMDE jako píky I–III, na PGE jako píky α – γ (obr. 2A,B). Na PGE se obvykle využívají pouze píky α a β , píky γ jsou nevýrazné (obr. 2B). Podstata uvedených píků nebyla blíže

Tabulka I
Nejčastěji používané ligandy pro modifikaci sacharidů šestimocným Os

Ligand	Zkratka	Redoxní píky	Katalytický pík na rtuťových elektrodách
Pyridin	py	ano	ne
2,2'-Bipyridin	bipy	ano	ano
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin	temed	ano	ne
1,10-Fenanthrolin	phen	ano	ano
Bathofenanthrolindisulfonová kyselina, dvojsodná sůl	bpds	ano	ano
2-(Dimethylaminomethyl)pyridin	dmamp	ano	ne

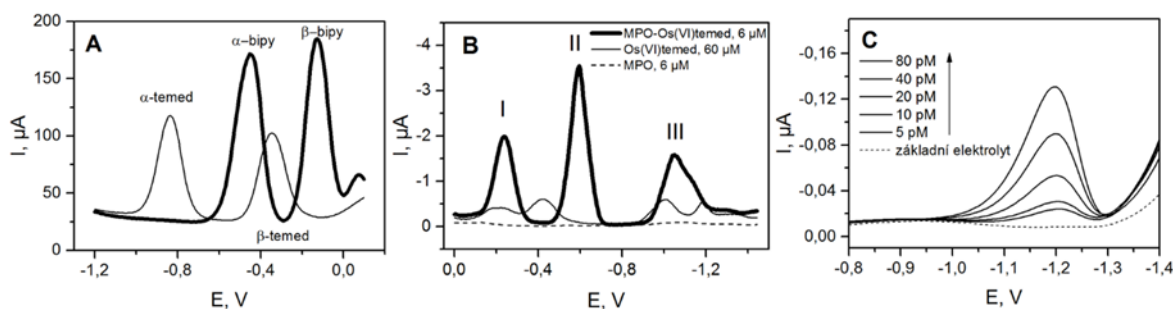


Obr. 2. Cyklické voltamogramy Os(VI)L modifikovaného dextranu; A) HMDE, rychlost skenu 2 V/s, koncentrace dextranu 4,86 $\mu\text{g/ml}$, B) PGE, rychlost skenu 1 V/s, koncentrace dextranu 16,2 $\mu\text{g/ml}$, A, B) Os(VI)temed modifikovaný dextran, 0,08 M pufr Brittonův-Robinsonův, pH 7,0, t_A 60 s, tenká tečkovaná čára je základní elektrolyt, C) HMDE, koncentrace dextranu 0,32 $\mu\text{g/ml}$, pufr 0,1 M Brittonův-Robinsonův, pH 4,75, rychlost skenu 0,1 V/s, t_A 60 s (převzato z práce⁴² se svolením Royal Society of Chemistry)

zkoumána, lze však očekávat, že zde probíhají podobné elektrodové procesy, jako při elektroredukcí oxidu osmičelého, kterou studovali J. Heyrovský³⁹ a L. Meites⁴⁰. Při této elektroredukcí bylo pozorováno v závislosti na použitím pufru a pH několik polarografických vln. Ve slabě kyselých pufrch byly obvykle pozorovány čtyři vlny²⁴. První vlna reprezentuje redukcí Os(VIII) na Os(VI), druhá vlna odpovídá redukcí Os(VI) na Os(IV), třetí vlna redukcí Os(IV) na Os(III). Čtvrtá vlna byla přisouzena katalytickému vylučování vodíku. Tato čtvrtá vlna se nevyskytuje v silně zásaditých médiích, jako např. v nasyceném roztoku hydroxidu vápenatého²³. V některých pufrch, jako např. v pufru složeném z pyridinu a jeho hydrochloridu, byla pozorována vlna, kterou bylo možno přisoudit redukci

ci Os(III) na Os(II) (cit.²⁴). Protože Os(VI)L modifikované sacharidy obsahují Os(VI), elektrodový proces přirozeně nezahrnuje redukcí Os(VIII) na Os(VI). Pík I na HMDE (obr. 2A) by mohl odpovídat redukcí Os(VI) na Os(IV), pík II redukcí Os(VI) na Os(III) (cit.³³), popř. pík III redukcí Os(III) na Os(II) nebo na kov. Podstatou katalytického píku volného oxidu osmičelého je katalytické vylučování vodíku³⁸. Předpokládalo se, že v případě oxidu osmičelého by katalytické vylučování vodíku mohlo být podmíněno jeho redukcí až na kov za vzniku krystalků kovového osmia⁴¹. Fakt, že katalytické vylučování vodíku je u Os(VI)L aduktů závislé na druhu ligandu, naznačuje, že elektrodový děj je mnohem složitější, zahrnuje silnou adsorpci aduktů na elektrodě a vliv ligandu L na katalytické vylučování vodíku. Z tab. I plyne, že katalytické vylučování vodíku podporují ligandy obsahující v molekule nejméně dva heterocyklické kruhy. U sacharidů modifikovaných Os(VI)temed katalytický pík obvykle chybí (obr. 2C), výhodou ligandu temed je však to, že vzorky lze měřit často přímo v reakční směsi, bez nutnosti purifikace, protože samotné činidlo Os(VI)temed dává obvykle malou odezvu, a navíc se z elektrody lehce smývá³³. Naproti tomu výhodou Os(VI)bipy modifikovaných sacharidů je možnost měřit katalytický pík, který je mnohem citlivější než redoxní píky, takže s ním lze stanovit podstatně nižší koncentrace látek⁴². Vzorky modifikované Os(VI)bipy je však nutno zbavit nezreagovaného modifikačního činidla.

Obr. 2 ukazuje příklady cyklických voltamogramů dextranu modifikovaného Os(VI)temed (obr. 2A–C) a Os(VI)bipy (obr. 2C). Pro zvýšení citlivosti se však namísto cyklické voltametrie používají jiné metody, jako např. adsorpční rozpouštěcí voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (adsorptive stripping square wave voltammetry, AdS-SWV), nebo adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdS differential pulse voltammetry, AdS-DPV). Při AdS-SWV na PGE lze obvykle měřit Os(VI)L modifikované oligosacharidy do koncentrací řádově stovek nM, při AdS-SWV na HMDE jsou to koncentrace řádově nM a při AdS-DPV na HMDE lze v některých případech měřit katalytický pík oligosacharidů modifikovaných Os(VI)bipy v oblasti pM koncentrací^{33,42,43}. Množství vzorku, potřebného pro voltametrické měření, lze podstatně snížit použitím techniky s přenosem vzorku (adsorpční přenosová rozpouštěcí voltametrie – AdTS-V). Technika AdTS-V (*ex situ*) je založena na tom, že se stanovuje analyt, který se silně adsorbuje na elektrodu z jednoho elektrolytu, pak se elektroda může opláchnout vodou, popř. i organickým rozpouštědlem, čímž se zbaví zejména nízkomolekulárních látek, které se adsorbují jen slabě, a potom se elektroda s adsorbátem přenesou do nádoby s elektrolytem, neobsahujícím zkoumanou látku, kde se provede vlastní měření. Adsorpce na elektrodu se může provádět i z malé kapky, objemu řádově jednotek až desítek μl (cit.^{44,45}), v závislosti na velikosti elektrody. Obr. 3 ukazuje příklady měření 3 α ,6 α -mannopentaosy (MPO) modifikované Os(VI)L. MPO byla vybrána proto, že její struktura má vztah k některým N-glykanům v glykoproteinech (obr. 4B). Obr. 3A ukazuje AdTS-SWV



Obr. 3. Voltamogramy **3a,6a** – mannopentaosy (MPO) modifikované Os(VI)L. A) AdTS-SWV na PGE, tlustá čára 20 μM MPO-Os(VI)bipy, tenká čára 20 μM MPO-Os(VI)temed, 0,2 M acetátový pufr, pH 5,0, vzorky byly adsorbovány z 8 μl kapek po dobu t_A 60 s při otevřeném proudovém okruhu, pak byla elektroda oplachována 60 s vodou, přenesena do nádoby se základním elektrolytem a bylo provedeno měření, frekvence 400 Hz, amplituda 50 mV, B) AdS-SWV na HMDE, 0,08 M pufr Brittonův-Robinsonův, pH 7, t_A 60 s, akumulací potenciál (E_A) 0 V, měřeno v nádobce za míchání, frekvence 200 Hz, amplituda 50 mV, nepurifikovaný vzorek, C) AdS-DPV na HMDE, měření katalytického píku MPO-Os(VI)bipy, koncentrační závislost, pufr Brittonův-Robinsonův pH 4,75, měřeno v nádobce za míchání, t_A 120 s, $E_A = -0,8$ V, modulační čas 0,05 s, čas intervalu 0,5 s, modulační amplituda 50 mV, iniciační potenciál $-0,8$ V, konečný potenciál $-1,45$ V, stupňový potenciál 5 mV

na PGE vzorků MPO-Os(VI)temed a MPO-Os(VI)bipy. Je zřejmé, že elektrodový potenciál faradaických piků závisí mimo jiné na druhu ligandu, což bylo použito k „vícebarevnému“ značení^{37,46}. Obr. 3B ukazuje AdS-SWV na HMDE nepurifikovaného vzorku MPO-Os(VI)temed ve srovnání s 10 \times koncentrovanějším volným modifikačním činidlem Os(VI)temed. Je zřejmé, že činidlo přesto, že je 10 \times koncentrovanější, dává ve srovnání se vzorkem jen malé píky. Obr. 3C ukazuje měření koncentrační závislosti katalytického píku MPO-Os(VI)bipy pomocí AdS-DPV v oblasti koncentrací 5–80 pM.

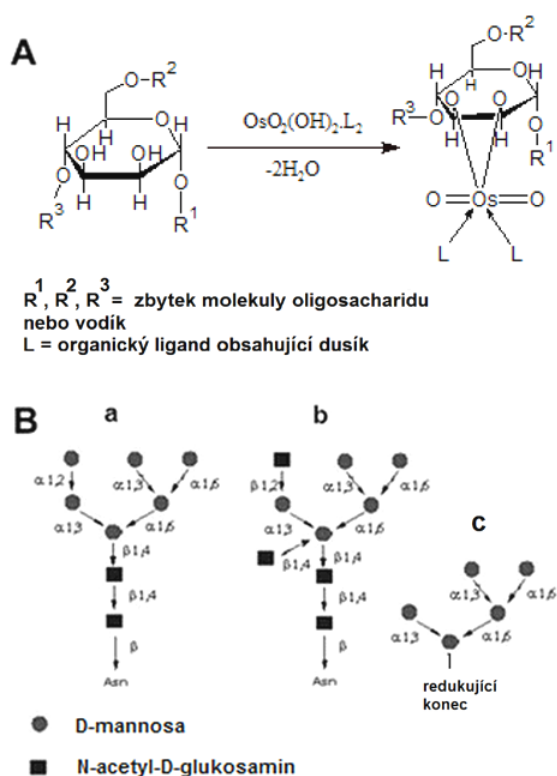
3.2. Modifikace glykanů a jejich voltametrická detekce přímo v glykoproteinech

V poslední době jsou pomocí modifikace Os(VI)L zkoumány glykanové složky přímo v glykoproteinech. Je známo, že 70–80 % všech lidských proteinů jsou glykoproteiny^{29,30} a glykosylace se podílí na mnoha fyziologických a patologických procesech, včetně rakoviny⁴⁷. Nejběžnější dosud používané metody analýzy glykanových složek glykoproteinů jsou založené na hmotnostní spektrometrii, kombinované obvykle s chromatografickými metodami^{29,48–51}, což vyžaduje nákladné laboratorní vybavení. Glykanové složky glykoproteinů se většinou při těchto metodách nejprve enzymaticky odštěpí od glykoproteinu, a dále upravují např. permethylací. Takové analýzy jsou obvykle i časově náročné. Jsou proto hledány nové metody analýzy glykoproteinů, které by byly jednodušší a rychlejší. Modifikace glykanových složek pomocí Os(VI)L a následná elektrochemická analýza by mohla být perspektivní metodou. Reakce Os(VI)L s 1,2-dioly připomíná reakci kyseliny boritá a boronových kyselin s 1,2- a 1,3-dioly, která je již k analýze glykanů využívána^{52,53}. Samotná kyselina boritá a fenyloboronová nejsou však elektrochemicky aktivní a pro voltametrickou detekci je nutno

použít jejich elektroaktivních derivátů. Reakce boronových kyselin s dioly je vratná, její průběh a rovnovážné konstanty závisí na chemické struktuře boronové kyseliny, pH a druhu pufru⁵⁴. V případě modifikace diolů Os(VI)L závisí průběh reakce a stabilita vzniklého aduktu do značné míry na druhu ligandu. Produkty modifikované Os(VI)py nejsou příliš stabilní, a při jejich purifikaci popř. izolaci je nutná přítomnost volného pyridinu v použitém rozpouštědle. Naproti tomu produkty modifikované Os(VI) s bidentátními heterocyklickými ligandy, jako temed, bipy, phen, bpds, jsou velmi stálé^{35,55,56}. V určitých případech by tak mohly adukty modifikované Os(VI)L s vhodným L být stabilnější a vhodnější pro analýzu než odpovídající adukty boronových kyselin.

V glykoproteinech se vyskytují různé typy glykanů, nejběžnější jsou *N*-glykany^{30,57}. Obr. 4B ukazuje jednoduché typy *N*-glykanů, které se nacházejí v ribonuklease B (RNaseB) a v avidinu. *N*-Glykany jsou navázány dvěma *N*-acetyl-D-glukosaminovými jednotkami na asparagin proteinu a obsahují vždy D-mannosu. Složitější typy glykanů obsahují kromě *N*-acetyl-D-glukosaminu a D-mannosu ještě další stavební jednotky, jako např. D-galaktosu, D-xylosu, L-fukosu a kyselinu sialovou^{30,57}. V jednom glykoproteinu se obvykle vyskytuje na tomtéž asparaginovém zbytku více typů glykanů příbuzné struktury. Ze struktury glykanů (obr. 4B) vyplývá, že mannosové jednotky, s výjimkou těch, ze kterých vychází větvení, a vnější *N*-acetyl-D-glukosaminové jednotky, obsahují 1,2-diol a mohly by být modifikovány Os(VI)L (obr. 4A). Naproti tomu dvě *N*-acetyl-D-glukosaminové jednotky, které zprostředkovávají vazbu k asparaginu, 1,2-diol neobsahují, a nejsou vhodné pro modifikaci.

Bylo zjištěno, že glykany v glykoproteinech lze v některých případech modifikovat Os(VI)L a analyzovat přímo, bez nutnosti enzymatického odštěpení glykanu a purifikace od zbytku proteinu^{58,59}. Avidin je glykopro-



Obr. 4. A) Schéma reakce oligosacharidu, obsahujícího mannosu, s šestimocnými komplexy osmia, B) Ukázka struktury jednoduchých glykanů (a) v RNaseB, (b) v avidinu, c) Struktura oligosacharidu 3a,6a – mannopentaosy (MPO) (převzato z práce⁵⁹ se svolením Elsevier)

tein, obsahující *N*-glykan (obr. 4B), zatímco jeho analog streptavidin (STV) není glykosylovaný. Avidin i STV jsou známy tím, že vytvářejí velmi silný komplex s biotinem^{60,61}. Obr. 5A ukazuje stanovení avidinu a STV modifikovaných komplexem Os(VI)temed, pomocí AdTS-SWV na PGE. Je zřejmé, že avidin se modifikuje Os(VI)temed a produkt je elektrochemicky aktivní, zatímco STV vystavený modifikačním podmínkám nedával téměř žádné signály. Avidin se navíc modifikuje i v komplexu s biotinem. Již dříve byla popsána modifikace avidinu a STV komplexem osmimocného osmia Os(VIII)bipy (cit.⁶²). Tímto činidlem lze avidin a STV modifikovat pouze tehdy, pokud není v komplexu s biotinem. Je to způsobeno tím, že účinkem Os(VIII)bipy se modifikuje tryptofan, který se účastní vazby na biotin, a je proto v komplexu avidin (STV) – biotin nepřístupný. Působením šestimocného Os(VI)temed se ale modifikuje glykan, který se na vzniku vazby avidin – biotin nijak nepodílí^{63,64}, a je proto přístupný působení modifikačního činidla i pokud je protein v komplexu s biotinem. Obr. 5B ukazuje koncentrační závislost SWV píku α Os(VI)temed modifikovaného avidi-

nu na PGE. Závislost je lineární v rozmezí 100 nM až 1 μ M, limit detekce je okolo 50 nM, a výška píku nezávisí na koncentraci při koncentraci vyšší než 10 μ M. Podobně jako dvojice avidin a STV byla zkoumána i dvojice ribonukleasa A (RNaseA) a RNaseB, kde RNaseA není glykosylována, zatímco RNaseB ano. Obr. 5C ukazuje AdTS-SWV 20 μ M RNaseA-Os(VI)bipy a RNaseB-Os(VI)bipy. Je zřejmé, že RNaseB-Os(VI)bipy poskytuje dva SWV píky α a β , zatímco RNaseA-Os(VI)bipy tyto píky téměř nedává. Podobně jako u jednoduchých sacharidů, lze u Os(VI)bipy modifikovaných produktů glykoproteinů měřit katalytický pík metodou AdS-DPV na HMDE. Tento pík je i v tomto případě mnohem citlivější než redox píky. Z vloženého obrázku na obr. 5D je patrné, že při 300 pM koncentraci dává RNaseB-Os(VI)bipy jasný katalytický pík, kdežto RNaseA-Os(VI)bipy při této koncentraci téměř žádný katalytický pík nedává. Na obr. 5D je také zřetelně koncentrační závislost výšky katalytického píku RNaseB-Os(VI)bipy, která je v oblasti 40 pM až 1 nM lineární⁵⁸.

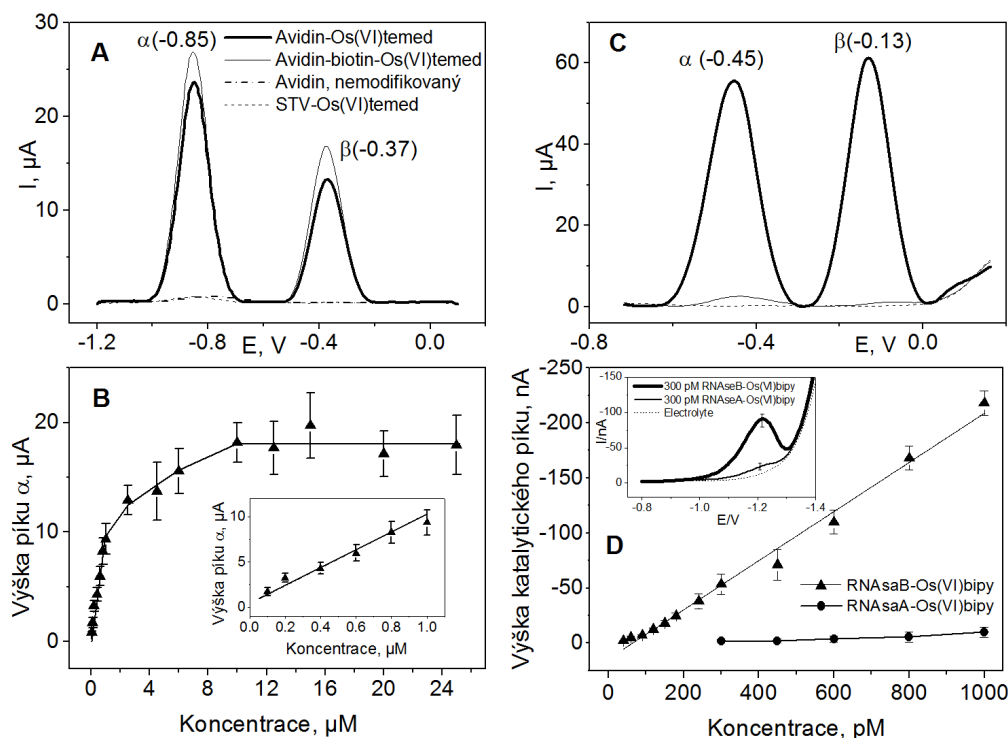
Voltamogramy různých typů Os(VI)L modifikovaných oligosacharidů se liší co do velikosti, popř. potenciálu jednotlivých píků, i když se jedná o isomery⁶⁵. To dává naději, že i v případě glykanů, obsažených v glykoproteinech a majících význam v diagnostice nemocí, se podaří rozlišit běžné formy glykanů od změněných, patologických, na základě jejich modifikace Os(VI)L a elektrochemie modifikovaných produktů.

4. Závěr

Historie elektrochemické analýzy bílkovin a nukleových kyselin sahá až do první poloviny minulého století^{66,67}, (shrnuto v přehledech^{7,38}) a výzkum elektrochemie těchto biomakromolekul je v současnosti kvetoucím vědeckým polem^{7,68}. Naproti tomu elektrochemie sacharidů má historii velmi krátkou. Polysacharidy byly donedávna považovány za látky elektrochemicky neaktivní za podmínek blízkých fyziologickým a při výzkumu glykanů a glykoproteinů jsou měřeny jejich interakce s lektiny pomocí impedimetrických metod^{69,70}.

Zcela nedávno bylo zjištěno, že chitosan a glykany obsahující volné aminoskupiny katalyzují vylučování vodíku na rtuťových elektrodách, a lze je elektrochemicky detegovat v nízkých koncentracích^{71,72}. Tento krátký přehled upozorňuje na další možnost využití elektrochemické analýzy v glykochemii s využitím chemické reaktivity komplexů šestimocného osmia. Podobně jako adukty komplexů Os(VIII)L s DNA^{2-7,25} jsou i adukty komplexů Os(VI)L s polysacharidy imunogenní⁷³ a dávají naději na další využití reaktivity těchto komplexů v bioanalýze a zvláště na zlepšení specifity důležitých biomarkerů, které jsou většinou glykoproteiny.

Je zajímavé, že pomocí modifikace glykanů komplexy Os(VI)L a následné voltametrické analýzy je možno rozlišit isomery glykanů⁶⁵, které jsou jen velmi obtížně rozlišitelné pomocí hmotnostní spektrometrie^{29,49,74}. Je



Obr. 5. **A)** AdTS-SWV 5 μM avidinu, komplexu avidin-biotin a STV, vystavených působení Os(VI)temed, nepurifikované vzorky, **B)** koncentrační závislost píku α avidinu ošetřeného Os(VI)temed, chybové úsečky jsou směrodatné odchylky ze čtyř měření, vložený graf: detail koncentračního rozsahu 100 nM – 1000 nM, **C)** AdTS-SWV 20 μM RNaseA a RNaseB ošetřených Os(VI)bipy a purifikovaných, tlustá čára RNaseB-Os(VI)bipy, tenká čára RNaseA-Os(VI)bipy, čárkovaná čára RNaseB nemodifikovaná; **A – C)** měřeno na PGE, podmínky měření jako na Obr. 3A (převzato z práce⁵⁹ se svolením Elsevier), **D)** závislost výšky katalytického píku na koncentraci u RNaseA a RNaseB po ošetření Os(VI)bipy a purifikaci vzorků, AdS-DPV, měřeno na HMDE, 0,12 M Brittonův-Robinsonův, pH 4,35, t_A 60 s, ostatní podmínky měření jako na Obr. 3 C, vložený obrázek: katalytické píky u 300 pM vzorků (převzato z práce⁵⁸ se svolením Elsevier)

zajímavé, že patologické formy glykanů se namnoze liší od jejich fyziologických forem přítomností odlišných isomerů^{32,75,76}.

Naše předběžné výsledky dávají naději, že modifikace volných glykanů i glykanů v glykoproteinech s využitím komplexů Os(VI)L se stane užitečnou metodou v biomedicině a přispěje k vypracování jednoduchých a levných diagnostických metod.

Poznámka přidaná při korektuře článku

Po odeslání této práce do tisku jsme koncem roku 2017 ukázali, že izomery glykanů 2,3-sialyllaktosy a 2,6-sialyllaktosy (důležité biomarkery v rakovině) lze rozlišit elektrochemicky po modifikaci Os(VI)temed na rtuťových a uhlíkových elektrodách⁷⁷.

Vypracováno s finanční podporou grantů GAČR 15-15479S, CAS RVO 68081707 a GAČR 17-08971S. Autor

děkuje prof. Emilu Palečkovi za cenné připomínky a kritické přečtení rukopisu.

Seznam zkratek

AdS-DPV	adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (adsorptive stripping differential pulse voltammetry)
AdS-SWV	adsorpční rozpouštěcí voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (adsorptive stripping square-wave voltammetry)
AdTS-SWV	adsorpční přenosová rozpouštěcí voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (adsorptive stripping square-wave voltammetry)
AdTS-V	adsorpční přenosová rozpouštěcí voltametrie (adsorptive transfer stripping voltammetry)

bipy	2,2'-bipyridin
bpds	bathofenanthrolindisulfonová kyselina, dvojsodná sůl
dsDNA	dvouřetězcová DNA (double stranded DNA)
E_A	akumulační potenciál (potenciál elektrody, při kterém se vzorek adsorbuje na elektrodu)
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda (hanging mercury drop electrode)
L	organický dusíkatý ligand
MPO	3 α ,6 α -mannopentaosa
NA	nukleová kyselina (nucleic acid)
Os(VI)bipy	komplex šestimocného osmia s bipy
Os(VIII)bipy	komplex osmimocného osmia s bipy
Os(VI)L	komplex šestimocného osmia s L
Os(VIII)L	komplex osmimocného osmia s L
Os(VI)py	komplex šestimocného osmia s py
Os(VI)temed	komplex šestimocného osmia s temed
PGE	elektroda z pyrolytického grafitu (pyrolytic graphite electrode)
phen	1,10-fenanthrolin
py	pyridin
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RNaseA	ribonukleasa A
RNaseB	ribonukleasa B
ssDNA	jednořetězcová DNA (single stranded DNA)
STV	streptavidin
t_A	doba akumulace vzorku (accumulation time)
temed	<i>N,N,N,N'</i> -tetramethylethylendiamin

LITERATURA

- Behrman E. J.: *Science of Biological Specimen Preparation*, SEM Inc., AMF O'Hare, Chicago 1984.
- Lukasova E., Jelen F., Palecek E.: *Gen. Physiol. Biophys.* **1**, 53 (1982).
- Palecek E., Hung M. A.: *Anal. Biochem.* **132**, 236 (1983).
- Palecek E., Lukasova E., Jelen F., Vojtiskova M.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* **8**, 497 (1981).
- Palecek E.: *Methods Enzymol.* **212**, 139 (1992).
- Palecek E., Jelen F., v knize: *Perspectives in Bioanalysis, Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins. Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics.*, Vol. 1 (Palecek E., Scheller F., Wang J., ed.), Elsevier, Amsterdam 2005.
- Palecek E., Bartosik M.: *Chem. Rev.* **112**, 3427 (2012).
- Palecek E., Jelen F., Minarova E., Nejedly K., Palecek J., Pecinka P., Rivicova J., Vojtiskova M., Zachova D.: *Structural Tools for the Analysis of Protein-Nucleic Acid Complexes* (Lilley D. M. J., Heumann H., Suck D., ed.), Birkhäuser Verlag, Basel 1992.
- Palecek E., v knize: *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 8 (Eckstein F., Lilley D. M. J., ed.), Springer-Verlag, Berlin 1994.
- Palecek E., Krejcová A., Vojtiskova M., Podgorodnichenko V., Ilyina T., Poverennyi A.: *Gen. Physiol. Biophys.* **8**, 491 (1989).
- Kuderova-Krejcová A., Poverennyi A. M., Palecek E.: *Nucleic Acids Res.* **19**, 6811 (1991).
- Palecek E., Robert-Nicoud M., Jovin T. M.: *J. Cell Sci.* **104**, 653 (1993).
- Billova S., Kizek R., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* **56**, 63 (2002).
- Deetz J. S., Behrman E. J.: *Int. J. Pept. Protein Res.* **17**, 495 (1981).
- Deetz J. S., Behrman E. J.: *J. Org. Chem.* **45**, 135 (1980).
- Sedo O., Billova S., Pena-Medrez E. M., Palecek E., Havel J.: *Anal. Chim. Acta* **515**, 261 (2004).
- Reske T., Surkus A. E., Duwensee H., Flechsig G. U.: *Microchim. Acta* **166**, 197 (2009).
- Palecek E.: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**, 151 (1991).
- Galazka G., Palecek E., Wells R. D., Klysik J.: *J. Biol. Chem.* **261**, 7093 (1986).
- Nejedly K., Klysik J., Palecek E.: *FEBS Lett.* **243**, 313 (1989).
- Karlovsky P., Pecinka P., Vojtiskova M., Makaturova E., Palecek E.: *FEBS Lett.* **274**, 39 (1990).
- Vojtiskova M., Mirkin S., Lyamichev V., Voloshin O., Frank-Kamenetskii M., Palecek E.: *FEBS Lett.* **234**, 295 (1988).
- Mcclellan J. A., Boublikova P., Palecek E., Lilley D. M. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 8373 (1990).
- Palecek E.: *Methods Enzymol.* **212**, 305 (1992).
- Havran L., Fojta M., Paleček E.: *Bioelectrochemistry* **63**, 239 (2004).
- Yosypchuk B., Fojta M., Havran L., Heyrovsky M., Palecek E.: *Electroanalysis* **18**, 186 (2006).
- Criegee R., Marchand B., Wannowius H. E.: *Justus Liebigs Ann. Chem.* **550**, 99 (1942).
- Trefulka M., Ostatna V., Havran L., Fojta M., Palecek E.: *Electroanalysis* **19**, 1281 (2007).
- Alley W. R., Mann B. F., Novotny M. V.: *Chem. Rev.* **113**, 2668 (2013).
- Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J.: *Essentials of Glycobiology*, 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2009.
- Belicky S., Tkac J.: *Chem. Pap.* **69**, 90 (2015).
- Gilgunn S., Conroy P. J., Saldova R., Rudd P. M., O'Kennedy R. J.: *Nat. Rev. Urol.* **10**, 99 (2013).
- Trefulka M., Palecek E.: *Electroanalysis* **22**, 1837 (2010).
- Resch J., Tunkel D., Stoeckert C., Beer M.: *J. Mol. Biol.* **138**, 673 (1980).
- Trefulka M., Palecek E.: *Electroanalysis* **25**, 1813 (2013).
- Daniel F. B., Behrman E. J.: *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 7352 (1975).
- Trefulka M., Palecek E.: *Electroanalysis* **21**, 1763 (2009).

38. Palecek E., Bartosik M., Ostatna V., Trefulka M.: *Chem. Rec.* 12, 27 (2012).
39. Crowell W. R., Heyrovsky J., Engelkemeir D. W.: *J. Am. Chem. Soc.* 63, 2888 (1941).
40. Meites L.: *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4631 (1957).
41. Heyrovsky J., Kuta J.: *Principles of Polarography*, Czechoslovak Academy of Science, Prague 1965.
42. Palecek E., Trefulka M.: *Analyst* 136, 321 (2011).
43. Trefulka M., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* 88, 8 (2012).
44. Palecek E., Jelen F., Teijeiro C., Fucik V., Jovin T. M.: *Anal. Chim. Acta* 273, 175 (1993).
45. Palecek E., Postbieglova I.: *J. Electroanal. Chem.* 214, 359 (1986).
46. Fojta M., Kostecka P., Trefulka M. R., Havran L., Palecek E.: *Anal. Chem.* 79, 1022 (2007).
47. Chandler K., Goldman R.: *Mol. Cell. Proteomics* 12, 836 (2013).
48. Wada Y., Azadi P., Costello C. E., Dell A., Dwek R. A., Geyer H., Geyer R., Kakehi K., Karlsson N. G., Kato K., Kawasaki N., Khoo K. H., Kim S., Kondo A., Lattova E., Mechref Y., Miyoshi E., Nakamura K., Narimatsu H., Novotny M. V., Packer N. H., Perreault H., Peter-Katalinic J., Pohlentz G., Reinhold V. N., Rudd P. M., Suzuki A., Taniguchi N.: *Glycobiology* 17, 411 (2007).
49. Banazadeh A., Veillon L., Wooding K. M., Zabet-Moghaddam M., Mechref Y.: *Electrophoresis* 38, 162 (2017).
50. Geyer H., Geyer R.: *BBA-Proteins Proteomics* 1764, 1853 (2006).
51. Ruhaak L. R., Zauner G., Huhn C., Bruggink C., Deelder A. M., Wührer M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3457 (2010).
52. Egawa Y., Seki T., Takahashi S., Anzai J.: *Mater. Sci. Eng., C* 31, 1257 (2011).
53. Anzai J.: *Mater. Sci. Eng., C* 67, 737 (2016).
54. Springsteen G., Wang B. H.: *Tetrahedron* 58, 5291 (2002).
55. Daniel F. B., Behrman E. J.: *Biochemistry* 15, 565 (1976).
56. Midden W. R., Chang C. H., Clark R. L., Behrman E. J.: *J. Inorg. Biochem.* 12, 93 (1980).
57. Lindhorst T. K.: *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim 2007.
58. Trefulka M., Dorcak V., Krenkova J., Foret F., Palecek E.: *Electrochim Acta* 239, 10 (2017).
59. Trefulka M., Palecek E.: *Electrochem. Commun.* 48, 52 (2014).
60. Green N. M.: *Methods Enzymol.* 184, 51 (1990).
61. Green N. M.: *Adv. Protein Chem.* 29, 85 (1975).
62. Fojta M., Billova S., Havran L., Pivonkova H., Cernocka H., Horakova P., Palecek E.: *Anal. Chem.* 80, 4598 (2008).
63. Hiller Y., Bayer E. A., Wilchek M.: *Methods Enzymol.* 184, 68 (1990).
64. Hiller Y., Bayer E. A., Wilchek M.: *Biochem. J.* 278, 573 (1991).
65. Trefulka M., Palecek E.: *Chem. Pap.* 69, 241 (2015).
66. Palecek E.: *Naturwissenschaften* 45, 186 (1958).
67. Palecek E.: *Nature* 188, 656 (1960).
68. Palecek E., Tkac J., Bartosik M., Bertok T., Ostatna V., Palecek J.: *Chem. Rev.* 115, 2045 (2015).
69. Bertok T., Katrlík J., Gemeiner P., Tkac J.: *Microchim. Acta* 180, 1 (2013).
70. Bertok T., Klukova L., Sediva A., Kasak P., Semak V., Micusik M., Omastova M., Chovanova L., Vlcek M., Imrich R., Vikartovska A., Tkac J.: *Anal. Chem.* 85, 7324 (2013).
71. Palecek E., Rimankova L.: *Electrochem. Commun.* 44, 59 (2014).
72. Palecek E.: *Electrochim Acta* 187, 375 (2016).
73. Strmecki S., Trefulka M., Zatloukalova P., Durech M., Vojtesek B., Palecek E.: *Anal. Chim. Acta* 955, 108 (2017).
74. Novotny M. V., Alley W. R., Mann B. F.: *Glycoconjugate J.* 30, 89 (2013).
75. Joshi L., Svarovsky S. A.: *Anal. Methods* 6, 3918 (2014).
76. Kailemia M. J., Park D., Lebrilla C. B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 395 (2017).
77. Trefulka M., Palecek E.: *Electrochem. Commun.* 85, 19 (2017).

M. Trefulka (*Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*): **Modification of Biomacromolecules with Six-valent Osmium Complexes and Electrochemical Analysis of the Modified Products**

This review is focused on the reaction of 1,2-diols with ligand complexes of six-valent osmium [Os(VI)L] (where L is a nitrogenous ligand) and possibilities of electrochemical analysis of yielded products. A number of biologically important molecules, such as mono-, oligo- and polysaccharides, RNA and glycoproteins, belong to compounds containing 1,2-diol in their structure. These compounds react with Os(VI)L yielding relatively stable ligand osmate esters which are electrochemically active and suitable to the electrochemical analysis. The ligand osmate esters give redox peaks at the mercury and carbon electrodes. The redox peaks are due to the electrochemical reduction or oxidation of osmium atoms. The osmate esters with some ligands give catalytic peaks at the mercury electrodes. The catalytic peak is due to the catalytic hydrogen evolution and is very sensitive. With the catalytic peak it is possible to measure picomolar concentrations in some cases. We have used reactions of Os(VI)L for the analysis of glycans and glycoproteins in relation to their great importance in biomedicine.

Keywords: reactions of six-valent osmium complexes, labeling of biologically important compounds, voltammetry, mercury and carbon electrodes, saccharides, nucleic acids, glycoproteins