

LEKTINOMIKA: NÁSTROJ PRE KLINICKÚ DIAGNOSTIKU

TOMÁŠ BERTÓK, JANA ŠEFČOVIČOVÁ,
PETER GEMEINER a JÁN TKÁČ

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

Kľúčové slová: lektín, lektinomika, diagnostika, glyko-proteín, biosenzor, biorozpoznávací element, bioanalytická metóda

Došlo 19.7.11, prijaté 29.9.11.

Obsah

1. Úvod
2. Od objavu lektínov k lektinomike
3. Konkrétne aplikácie lektínov v klinickej praxi
4. Biosenzory založené na lektínovom biorozpoznávaní
5. Záver

1. Úvod

Mnohé aplikácie analytickej chémie sa v súčasnosti zaoberajú analýzou biologických vzoriek. Detekcia analytov aj vo veľmi nízkych koncentráciách je však často veľmi obtiažna, aj vzhľadom na veľké množstvo štruktúrne a funkčne podobných látok prítomných v biologických vzorkách. Obrovskú úlohu zohrali za posledné roky v tejto oblasti najmä biosenzory – zariadenia využívajúce pri detekcii analytov zo vzoriek biorozpoznávacie molekuly (enzýmy, nukleové kyseliny a ich aptaméry, receptory, biomimetiká), resp. celé biologické systémy (bakteriofágy, bunkové organely, celé bunky, pletivá alebo tkanivá), ktoré sa nachádzajú v úzkom kontakte s fyzikálnym prevodníkom. Aj v ostatných bioanalytických metódach sa využíva najmä špecifická interakcia medzi biorozpoznávacím elementom a skúmaným analytom. Pre oblasť špecifického biorozpoznávania sa v súčasnosti veľmi úspešne využívajú lektíny. Podľa definície IUPAC ide o (glyko)proteíny s vysokou afinitou k sacharidickým štruktúram (pre schopnosť zhlukovať cukry dostali názov aglutiníny), izolované predovšetkým z rastlín, ale aj mikroorganizmov a živočíchov¹ (tab. I, kap. 3). Nakoľko väčšina proteínov podliehajúcich posttranslačným modifikáciám je glykozylovaná, pričom tieto glykozylácie vykazujú pri určitých patologických stavoch isté abnormality (napr. zvýšené zastúpenie určitého sacharidu), je možné využiť lektíny na špecifickú detekciu markerov niektorých ochorení. Tento článok sa ďalej zaoberá najmä systematickou kategorizáciou lektínov a bioanalytickými metódami využívajúcimi

lektíny, vrátane biosenzorov založených na lektínoch ako biorozpoznávacích elementoch, a to pri štúdiu glykokódu (povrchových determinantov) bunkových (napr. erytrocyty), ale aj subcelulárnych útvarov (napr. vírus HIV, protilátky) a pri detekcii bakteriálnych patogénov a markerov niektorých ochorení vo vzorkách biologického pôvodu.

2. Od objavu lektínov k lektinomike

Lektíny sú látky s regulačnými, informačnými a ochrannými funkciami. Názov dostali v roku 1954 (Boyd, lat. *legere* = vybrať)². Aj napriek ich špecifite k určitému typu sacharidickej štruktúry, niektoré lektíny vykazujú afinitu aj k iným (štruktúrne podobným typom) sacharidom. Sacharidy ako informačné molekuly majú väčší potenciál oproti nukleovým kyselinám aj proteínom. Vytvárajú totiž vetviace sa reťazce a rôzne priestorové štruktúry, môžu teda teoreticky vytvárať väčšie množstvo kombinácií. Napr. dve aminokyseliny vytvorí iba dva možné dipeptidy, dve hexózy však môžu teoreticky vytvoriť až 36 rôznych disacharidov (aj keď sa všetky v prírode prirodzene nevyskytujú). Prítomnosť rôznych glykokonjugátov na povrchu buniek (glykoproteíny, glykolipidy) zohráva dôležitú úlohu napr. pri určovaní krvných skupín, alebo v prípade infekcie sú tzv. selektíny (kontinuálne exprimované leukocytmi) zodpovedné za zvýšenú afinitu bielych krviniek k určitým typom endoteliálnych buniek (pri mechanickom poškodení). Špecifická väzba lektínu so sacharidickým zvyškom je umožnená najmä vytvorením vodíkových mostíkov a interakciou medzi hydrofóbnymi časťami sacharidov a aromatickými časťami proteínových štruktúr (ako je to napr. v prípade interakcie ľudského galektínu-2 s β -galaktozidmi). Prvý lektín bol zrejme pozorovaný už v roku 1853 vo vzorkách chorých ľudských tkanív – išlo o substanciu zhlukujúcu cukry, ktorá tvorila v bunkách tkanív inklúzne telieska (Charcot-Leydenove kryštály) (Charcot, Robin). Tvrdenia o objave živočíšneho lektínu pochádzajú však až z roku 1974 (asialoglykoproteínový receptor pečene)³. I napriek ich významnej úlohe v biorozpoznávaní sa lektíny nepovažujú za súčasť imunitného systému (a to aj napriek skutočnosti, že sa môžu na povrchu makrofágov podieľať na detekcii a fagocytóze napr. fungálnych patogénov – dectin-1)⁴. Mnohé vykazujú antifungálnu aktivitu, napr. proteíny s označením PR-4 (viažuce sa na chitín – napr. STA lektín, s aktivitou proti *Botrytis cinerea* alebo *Trichoderma sp.*)⁵. Izolované boli z najrôznejších zdrojov, ako bakteriálne patogény (*Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, enterotoxigénna *Escherichia coli*), huby (*Agaricus bisporus*, *Aleuria aurantia*, *Psathyrella velutina*), živočíchy a rastliny. Veľmi početná je skupina rastlinných lektínov, z ktorých mnohé sú dnes komerčne dostupné a využívané najmä v oblasti laboratórnej klinickej diagnostiky a glyko-

mického výzkumu. Okrem delenia lektínov podľa pôvodu je ďalej možné ich rozdelenie podľa funkcie (tzv. L-lektíny slúžiace na triedenie bielkovín v endoplazmovom retikule; C-lektíny, vyžadujúce pre správnu funkciu kation Ca^{2+}), endogénne a exogénne, resp. delenie na základe ich špecificity³:

- GalNAc-špecifické aglutiníny,
- Gal-špecifické aglutiníny,
- Man a/alebo Glc-špecifické aglutiníny,
- GlcNAc a/alebo Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1-špecifické aglutiníny,
- L-Fuc-špecifické aglutiníny,
- aglutiníny špecifické pre kyselinu sialovú.

(skratky pre jednotlivé sacharidy sú uvedené v tab. I).

Hlavným cieľom lektinomyky je dešifrovanie glykódu jednotlivých organizmov, u ktorých glykozylácia predstavuje veľmi efektívny proces posttranslačnej modifikácie proteínových štruktúr, a to s využitím lektínov. Existujú aj ďalšie molekuly proteínovej povahy, často aj s vyššou afinitou k sacharidom, ktoré však nespádajú do oblasti lektinomyky – protilátky špecifické pre sacharidy, enzýmy modifikujúce sacharidy a transportné systémy pre prenos mono- a disacharidov do buniek (Gabiús a spol.)⁷. Ide o jadrové aj cytoplazmové proteíny, vrátane transkripčných faktorov, komponentov cytoskeletu, metabolické enzýmy aj signálne molekuly. Zmeny v glykozylácii, spôsobené mutáciami v modelových organizmoch defektných v glykozylyltransferázach, navyše vedú k rozvoju degeneratívnych ochorení, ako Alzheimerova choroba, reumatoidná artritída, skleróza multiplex, alebo niektoré druhy rakoviny^{6–8}. Mnohé práce sa zaoberajú aplikáciou lektínov pri diagnostike PSA (prostatický špecifický antigén). Pomocou metód, ako je napr. povrchová plazmónová rezonancia (SPR)⁸, je ďalej možné určiť mieru afinity lektínu k sacharidickým štruktúram (vyjadrením asociačných, resp. disociačných konštánt). Pre praktické využitie je však potrebné poznať najmä špecificitu jednotlivých lektínov. Existujú i lektíny s nedostatočne známou, resp. nízkou špecificitou. Tieto lektíny sú nevhodné pre diagnostické účely. Príkladom môžu byť rastlinné lektíny AAR (ex *Aloe arborescence*), ALJ (ex *Albizia julibrissin*), CAL (resp. CRL, ex *Cicer arietinum*), MIA (ex *Mangifera indica*) alebo PAA (ex *Persea americana*).

O praktickom význame lektínov svedčí aj počet pacientov, ktorý za 20 rokov (1986–2006) dosiahol počet 639 (cit.⁹). S rozvojom nových technológií sa navyše pristúpilo k využívaniu rekombinantných, resp. umelo skonštruovaných (artificiálnych) lektínov. Hlavná výhoda prípravy rekombinantných lektínov spočíva v pomerne vysokých výťažkoch oproti izolácii z rastlinných materiálov, problémy však spôsobujú posttranslačné modifikácie lektínov (hypo-/hyperglykozylácie). Bežne sa využívajú systémy ako baktérie *E. coli* BL21/DE3, kvôli vyššej podobnosti s rastlinami však častejšie kvasinky (najmä *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*), ale aj bunkové kultúry (rastlinné – tabak, alebo kultúry buniek z opičích obličiek). Rekombinantne boli pripravené napr. lektíny rec PSA, rec

WGA-II, rec SBA, rec RCA, rec PHA-E, rec Gal-I alebo rec MAH. Príprava umelých lektínov sa riadi najmä štúdiom jednotlivých aminokyselín v sekvencii proteínu a prostredníctvom mutačných zásahov (bodové mutácie, inzercie a delécie)⁹. Z artificiálnych proteínov sa v posledných rokoch pomerne veľká pozornosť venovala štruktúram (napr. aj proteínovým aptamérom) derivatizovaných pomocou kyseliny boritej (tzv. boronolektíny). Tieto umelé štruktúry mimikovali funkciu prírodných lektínov, vzhľadom na vysokú afinitu kyseliny boritej k cis/trans-diolom^{10,11}.

3. Konkrétne aplikácie lektínov v klinickej praxi

Glykány sú zodpovedné za moduláciu širokej palety biologických procesov, ako bunková diferenciácia, interakcia medzi hostiteľom a patogénom, či rozvoj niektorých ochorení. Nakoľko ale štruktúru glykánov nie je možné „čítať“ priamo z genómu, vyvinuli sa metódy slúžiace k ich identifikácii. Medzi najpoužívanejšie patria tzv. „microarrays“, využívajúce buď glykány viazané na nosič, alebo imobilizované ligandy (viažúce glykány, ako lektíny alebo protilátky). Analýza glykánov v 2D-formáte sa obvykle označuje ako „chip“. Array formát bol aplikovaný aj na iné biomolekuly – DNA (1995) alebo proteíny (2000)¹². Glykánové analýzy boli využité napr. pri identifikácii patogénnej baktérie *Bacillus anthracis*, či vírusu chrípky H5N1 (cit.¹³). Lektínové microarray boli uvedené v roku 2005. Praktické aplikácie spočívajú v diagnostike patogénov (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*)¹⁴, hľadani markerov ochorení (napr. v dôsledku zmien v glykozylácii α -fetoproteínu v dôsledku HCC – „hepatocellular carcinoma“). Dôležitú úlohu zohrali aj pri charakterizácii vírusu *Herpes simplex* (HSV-1, s využitím lektínov MAA a SNA) a pri objasnení mechanizmu exocytózy vírusu HIV-1 z napadnutých buniek. Na tento účel sa použil panel s 68 imobilizovanými lektínmi, pričom sa potvrdil vysoký stupeň podobnosti v glykozylácii povrchov HIV-1 a tzv. mikrovezikul, pričom obe sú odvodené od hostiteľských membrán T-bunkovej línie H9. Toto maskovanie je pravdepodobne dôvod, prečo nie je hostiteľský organizmus schopný efektívnej imunitnej odpovede¹⁴. Medzi najvyužívanejšie lektíny v oblasti diagnostiky patria hlavne rastlinné lektíny (najmä z rôznych strukovín). Väčšinou vytvárajú diméry alebo tetraméry, zložené z identických, alebo takmer identických subjednotiek – majú teda väčšinou dve a viac väzobných miest. Príkladom môže byť tetramérna štruktúra konkanavalínu A (Con A) na obr. 1 (cit.¹⁵). Ten je dnes modelovým lektínom pre väčšinu štúdií. V čistej forme bol získaný už v roku 1919 (J. B. Sumner), a tak ako ostatné lektíny špecifické na manózu vyžaduje viazané kationy Ca^{2+} . Príklady ďalších dostupných lektínov, vrátane ich zdroja a špecificity, sú uvedené v tab. I (cit.^{14,16–22}).

Ďalšie, v súčasnosti využívané laboratórne metódy zahrňujúce lektíny, sú najmä¹⁴:

- aglutinačné metódy / kvantitatívna precipitácia, využité napr. pri štúdiu zmeny glykozylačného profilu PSA

Tabuľka I

Prehľad niektorých exogénnych lektínov, najmä komerčne dostupných a využívaných lektínov, vrátane ich prírodného zdroja a špecificity

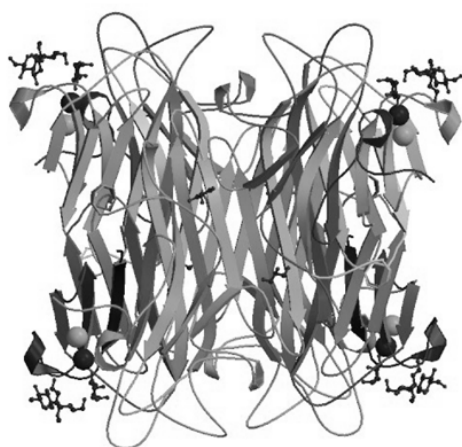
Lektín	Systematický názov	Zdroj ^a	Špecificita
AAA	<i>Anguilla anguilla</i>	Ž	α -L-Fuc
AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	H	α -L-Fuc
ABL	<i>Agaricus bisporus</i>	H	Gal β (1-3)GalNAc, GlcNAc
AOL	<i>Aspergillus oryzae</i>	MO	α -L-Fuc
APA (abrin)	<i>Abrus precatorius</i>	R	Gal β (1-3)GalNAc
BPA	<i>Bauhinia purpurea</i>	R	Gal β (1-3)GalNAc
CFL	<i>Cratylia floribunda</i>	R	α -D-Man, α -D-Glc
CFT agglutinin	<i>Codium fragile subsp. tomentosoides</i>	R	GalNAc
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	R	α -D-Man, α -D-Glc
Con Br	<i>Canavalia brasiliensis</i>	R	α -D-Man, α -D-Glc
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	R	Gal β (1-3)GalNAc
DGL	<i>Dioclea grandiflora</i>	R	α -D-Man, α -D-Glc
DSA (DSL)	<i>Datura stramonium</i>	R	GlcNAc β (1-4)GlcNAc
DVL	<i>Dioclea violacea</i>	R	α -D-Man, α -D-Glc
ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	R	Gal β (1-4)GalNAc
EUE	<i>Euonymus europaeus</i>	R	Gal α (1-3)Gal
Favin	<i>Vicia faba</i>	R	α -D-Man, α -D-Glc
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	R	α -D-Man
GSA-I	<i>Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia</i>	R	Gal α (1-3)Gal
GSA-II	<i>Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia</i>	R	GlcNAc
HAA	<i>Helix aspersa</i>	Ž	α -GalNAc
HBA	<i>Hevea brasiliensis</i>	R	GlcNAc
HHL	<i>Hippeastrum hybrid</i>	R	D-Man α (1-3) (1-6) viazaná
HPA	<i>Helix pomatia</i>	Ž	α -GalNAc, α -GlcNAc, α -Gal
CHA	<i>Cymbidium hybrid</i>	R	α -D-Man
Jacalin (AIL)	<i>Artocarpus integrifolia</i>	R	Gal β (1-3)GalNAc
LBA	<i>Phaseolus lunatus</i>	R	D-GalNAc, GlcNAc β (1-4) viazaná
LCA (LCH)	<i>Lens culinaris</i>	R	α -D-Man, α -D-Glc
LEA	<i>Lycopersicon esculentum</i>	R	[GlcNAc β (1-4)] ₂₋₄
LFA (LMA)	<i>Limax flavus</i>	Ž	Neu5Ac α (2-3), (2-6), (2-8) viazaná
LOA	<i>Listera ovata</i>	R	D-Man α (1-3) viazaná
LPA	<i>Limulus polyphemus</i>	Ž	Neu5Ac
LTA (Lotus lectin)	<i>Lotus tetragonolobus</i>	R	α -L-Fuc
MAA (MAL, MAH)	<i>Maackia amurensis</i>	R	Neu5Ac α (2-3) viazaná
MHA	<i>Myrianthus holstii</i>	R	GlcNAc
MPA	<i>Maclura pomifera</i>	R	Gal β (1-3)GalNAc
NPA	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	R	α -D-Man
PHA-E (E4-PHA)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	R	Man oligosacharidy
PHA-L (L4-PHA)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	R	vetvený β (1-6) GlcNAc

^a R – rastlina, Ž – živočích, H – huba, MO – mikroorganizmus (cit. ^{12, 14–20}); Fuc – fukóza, Man – manóza, Neu5Ac – N-acetylneuraminová kyselina (NANA), Gal – galaktóza, Glc – glukóza, GalNAc – N-acetylgalatózamín, GlcNAc – N-acetylglukózamín

Tabuľka I
Pokračovanie

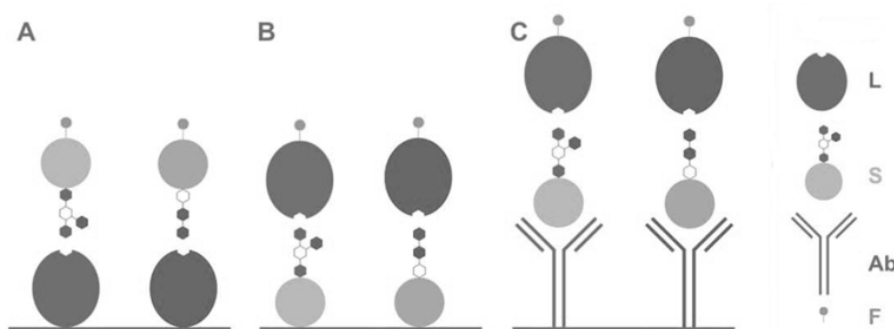
Lektín	Systematický názov	Zdroj ^a	Špecificita
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	R	Gal β (1-3)GalNAc
PSA	<i>Pisum sativum</i>	R	α -D-Man
PSL	<i>Psathyrella velutina</i>	H	β -D-GlcNAc
PWM	<i>Phytolacca americana</i>	R	[GlcNAc]3
RCA-I	<i>Ricinus communis</i>	R	β -D-Gal
RCA-II	<i>Ricinus communis</i>	R	Gal β (1-4) GalNAc
RPA	<i>Robinia pseudoacacia</i>	R	β -D-GalNAc
SBA	<i>Glycine max</i>	R	α , β -Gal, α , β -GalNAc
SJA	<i>Sophora japonica</i>	R	Gal β (1-3)GalNAc
SNA-I	<i>Sambucus nigra</i>	R	Neu5Ac α (2-6)Gal
SNA-II	<i>Sambucus nigra</i>	R	Gal, GalNAc
SOH	<i>Soja hispida</i>	R	β -D-GalNAc
STA	<i>Solanum tuberosum</i>	R	[\mathbf{\beta-D-GlcNAc]2-5
TML	<i>Tritrichomonas mobilensis</i>	MO	Neu5Ac α (2-3), (2-6) viazaná
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	R	α -L-Fuc
UEA-II	<i>Ulex europaeus</i>	R	GlcNAc β (1-4)GlcNAc
VML	<i>Vatairea macrocarpa</i>	R	α -D-GalNAc
VVA (VVL)	<i>Vicia villosa</i>	R	α -D-GalNAc
WBA	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	R	β -D-GalNAc
WFA	<i>Wisteria floribunda</i>	R	α , β -GalNAc
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	R	β -D-GlcNAc, Neu5Ac

^a R – rastlina, Ž – živočích, H – huba, MO – mikroorganizmus (cit. ^{12, 14–20}); Fuc – fukóza, Man – manóza, Neu5Ac – *N*-acetylneuraminová kyselina (NANA), Gal – galaktóza, Glc – glukóza, GalNAc – *N*-acetylgalatózamín, GlcNAc – *N*-acetylglukózamín



Obr. 1. Štruktúra konkanavalínu A (con A z *Canavalia ensiformis*), tetramérna štruktúra, obsahujúca štyri väzobné miesta. Zdroj: <http://www.pdb.org>

- prostatický špecifický antigén, s využitím Con A, čo umožnilo odlišenie medzi rakovinou prostaty a benígnou hyperpláziou, alebo pri epidemiologických štúdiách *Staphylococcus aureus*, či *Helicobacter pylori*,
- cytochemické metódy (fluorescenčné značenie sacharidov v tkanivách s využitím väzby so značeným lektínom),
- ELLA (lektínová assay s viazaným enzýmom). Ide prakticky o modifikáciu metódy ELISA, kedy sa povrch s nanesenými glykoproteínmi po vyblokování nešpecifických interakcií inkubuje s biotinylovaným lektínom, a následne sa aplikuje v poslednom kroku avidínom modifikovaná značka, napr. HRP (chrenová peroxidáza). Rôzne usporiadania pri aplikácii ELLA metódy sú znázornené na obr. 2 (cit. ^{9,23}):
- lektínová afinitná chromatografia^{24,25}. Kolóny s imobilizovanými lektínmi ako stacionárnou fázou špecificky viažu komplementárny glykokonjugát zo



Obr. 2. Možné usporiadania pri ELLA metóde; A) imobilizovaný lektín a značený glykokonjugát, B) imobilizovaný glykokonjugát a značený lektín, C) sandwichové usporiadanie; L – ligand (lektín), S – substrát, Ab – protilátka, F – fluorescenčná značka (ale napríklad aj biotín, na ktorý sa neskôr viaže značený avidín), (cit.⁹)

vzorky. Táto metóda bola aplikovaná na identifikáciu glykoproteínov so zvýšeným obsahom kyseliny sialovej, ako sérových markerov pri rakovine pankreasu (2006),

- lektínové blotovanie (modifikované western blotovanie/imunoblotovanie),
- prietoková cytometria – využívajúca FITC-značené lektíny (fluoresceín izotiokyanát). Tieto lektíny emitujú po excitácii svetlo väčšej vlnovej dĺžky, ako je vlnová dĺžka zdroja.

Ako bolo spomenuté, mnohé ochorenia sú sprevádzané abnormálnymi glykozyláciami rôznych proteínových štruktúr. Medzi ne patria rôzne chronické zápaly a zápalové ochorenia, ako napr. reumatoidná artritída či chronická juvenilná artritída, traumy, akútna flegmonózna apendicitída, cystická fibróza, celiakia, Creutzfeldova-Jacobova choroba, diabetes, imunodeficiencia, niektoré dedičné ochorenia a niektoré typy rakoviny – najmä rakovina prsníka, močového mechúra, pečene, prostaty, obličiek, štítnej žľazy, kľčka maternice alebo leukémia^{14,26–29}. Nemusi ísť pritom vždy o glykozylačné zmeny bunkových determinantov. Často dochádza aj ku zmene glykozylácie látok ako sú imunoglobulíny (IgG pri reumatoidnej artritíde), či hCG (ľudský choriogonadotropín). V druhom prípade sa využila tzv. sandwichová lektínová immunoassay na porovnanie glykozylácie hCG počas tehotenstva, a pri malígnej trofoblastickej neoplázii (s využitím lektínov GNA, MAA a WGA)³⁰. V neposlednej rade sa objavili aj práce zaoberajúce sa cieľným transportom liečiv v organizme, využívajúce lektíny s vysokou afinitou k určitým tkanivám. Pri liečení nádorových ochorení umožňuje dokonca táto metóda okrem cieľného vyhľadania nádoru aj jeho terapiu s využitím toxického efektu lektínov ako ricín alebo viskotoxín^{31,32}.

4. Biosenzory založené na lektínovom biorozpoznávaní

Biosenzory sú analytické zariadenia využívajúce špecifické interakcie (biologický signál) medzi biorozpozná-

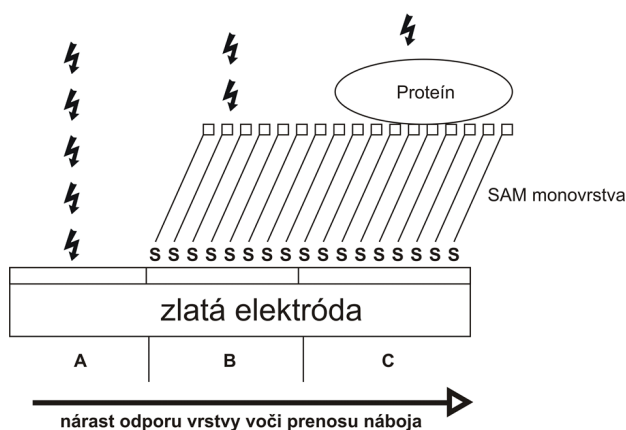
vacím elementom (biomolekuly ale i celobunkové systémy) a skúmaným analytom, pričom tento biorozpoznávací element je v úzkom kontakte s fyzikálnym prevodníkom, ktorý premieňa biologický signál na merateľný fyzikálny signál³³. Ako príklad využívaných biomolekúl pri príprave biosenzorov môžu slúžiť nukleové kyseliny a ich aptaméry³⁴, proteíny (enzýmy, protilátky, ale aj lektíny) a ich aptaméry^{35,36}, receptory a biomimetiká. V posledných rokoch nastal rozvoj práve lektínových biosenzorov, a to nie len pre oblasť medicínskej diagnostiky (stanovenie glukózy v krvi či určenie krvných skupín), ale i poľnohospodárskeho a potravinového priemyslu (mikroorganizmy) ako aj environmentálneho monitorovania (environmentálne polutanty – kys. 2,4-dichlorofenoxyoctová a ťažké kovy)³⁷. Medzi doposiaľ najviac využívané typy prevodníkov v oblasti lektínových biosenzorov patria elektrochemické (ampérometrické a potenciometrické, resp. meranie impedancie – EIS) a piezoelektrické (QCM – Quartz Crystal Microbalance) prevodníky. Navrhnutá bola aj elektrochemická lektínová sonda (2010) – lektín (ConA) konjugovaný s ferocenylovým derivátom (FcCOOH, elektrochemická sonda) pre *in situ* evaluáciu manozylových determinantov na bunkových povrchoch nádorových buniek (K562) (cit.³⁸). V tom istom roku bola vyvinutá ultrasenzitívna platforma – NanoMonitor (Nagaraj) pre rýchlu analýzu glykánových biomarkerov bez využitia značky. NanoMonitor pracuje na princípe elektrochemickej impedančnej spektroskopie. Impedancia sa mení po naviazaní glykánu na lektín, ktorý je imobilizovaný na zlatej elektróde. NanoMonitor je pritom silikónový čip, na ktorom sa nachádza súbor viacerých zlatých elektród. Osvedčil sa pri detekcii ľudských nádorových pankreatických bunkových línií³⁹.

Väčšina lektínových biosenzorov je založená na meraní zmien impedancie, resp. prúdovej odozvy pri cyklickej voltometrii. V posledných rokoch bolo vyvinutých aj niekoľko biosenzorov, kde bol na vopred upravený povrch elektród (ako fyzikálneho prevodníka) imobilizovaný cukor (pre štúdium interakcií lektínu s glykánom). Príkladom je BDD (bórom obohatená diamantová) elektróda, na ktorú sa pomocou oxidácie (UV/ozón) imobilizovali alkynylové

skupiny, a tie sa následne (za katalýzy medi) modifikovali sacharidickými zvyškami s obsahom azidov (tzv. CuACC, „klik“ reakcia – Cu-katalyzovaná azid-alkýnová cykloadícia)⁴⁰. Pre tento konkrétny prípad bola ako vyhodnocovacia metóda použitá EIS (metóda na meranie zmeny impedancie na povrchu prevodníka s rozpusteným mediátorom, obr. 3, cit.⁴¹).

V prípade biosenzorov využívajúcich lektín ako bio-rozpoznávací prvok sa často pristupuje k postupu označovanému ako „LBL self-assembly“ (Layer-by-layer = vrstva po vrstve), kde sa na elektródy postupne nanášajú jednotlivé vrstvy, ktoré navzájom interagujú, čím dochádza k ich stabilizácii na povrchu. Takto pripravený biosenzor môže (v závislosti od typu použitého lektínu) slúžiť na identifikáciu mikroorganizmov (*Escherichia coli* DH5 α , *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, ale aj cicavčie *HeLa* bunky). Zlatá elektróda sa v týchto prípadoch modifikovala najskôr 3-merkaptó-1-propánsulfónovou kyselinou, následne postupne polykatiónom (polyallylamín hydrochlorid, PAH) a polyaniónom (polysodium-*p*-styrén-sulfonát). Po opakovanom kroku aplikácie polykatiónu bolo možné elektrostaticky naviazať na povrch elektródy lektín, napr. Con A alebo RCA (cit.⁴²). Pri takejto modifikácii je možné do vrstvy zakomponovať aj nanočastice – napr. viacstenné uhlíkové nanorúrky (MWCNTs), ktoré sa na povrch elektródy nanášajú v jednom kroku (modifikované) spolu s polykatiónom (PAH). Lektín (v tomto prípade Con A) môže navyše slúžiť na spájanie dvoch enzýmov vo vrstve (tzv. bienzýmová nanomultivrstva)⁴³.

Niekoľko prác sa zaoberá aj detekciou vírusov pomocou lektínových biosenzorov. V roku 2008–2011 sa objavili štúdie, ktorých cieľom bolo pripraviť senzor citlivý na dengue vírus (čel'ad' *Flaviviridae*) v krvi pacientov^{44–46}. Tento vírus prenášaný komármi spôsobuje vyrážky



Obr. 3. Schéma merania impedancie (odporu vrstvy voči náboju pri prechode elektrického prúdu modifikovanou elektródou); najnižší odpor pri nedomodifikovanej elektróde (A), tento odpor však rastie pri sorpcii ďalších molekúl na povrch elektródy, ako je SAM („self-assembled monolayer“ – samousporiadaná monovrstva, B) a proteín (C)

a horúčkovité stavy najmä v rozvojových tropických krajinách. Väčšina bioanalytických metód spoľieha pri diagnostike tohto ochorenia na detekciu dengue-špecifických protilátok IgM a IgG. Lektíny použité v tomto prípade boli Con A a CramoLL (z rastliny *Cratylia mollis*, čo je strukovina, navyše má tento lektín rovnakú špecificitu ako Con A). Tieto lektíny boli imobilizované na zlaté elektródy spolu s polyvinyl butyralom a nanočasticami Fe₃O₄. Na vyhodnotenie prípadných interakcií, ktoré sa prejavajú aj ako zvýšenie odporu vrstvy na fyzikálnom prevodníku, bola použitá EIS (cit.^{44–46}).

Pre jednoduchú imobilizáciu na zlatý povrch možno využiť aj tzv. SAMs (self-assembled monolayers, samousporiadané monovrstvy), ktoré vznikajú na zlatých povrchoch po ich expozícii tiolovanými derivátmi. V najjednoduchšom prípade je možné použiť tiolovaný sacharid (SH-Man). Na takto pripravenú monovrstvu je možné imobilizovať lektín. Detekcia analytu je následne opäť možná pomocou EIS, alebo v sandwichovom usporiadaní aj tzv. „stripping“ voltametrou. Ide o veľmi citlivú metódu na detekciu stôp kovov v roztoku, pričom prvým krokom pri tomto type voltametrie je elektrodepozícia kovu na určitý povrch⁴¹. Tento povrch môže byť napr. zlatá nanočastica s imobilizovanou SH-Man, ktorá sa po naviazaní na lektín pokrýva vrstvou striebra. To sa následne opätovne rozpustí v 50% HNO₃ a stanovuje pomocou tzv. „anode-stripping“ voltametrie⁴⁷.

Pripraviť je však možné aj biosenzory pre detekciu lektínov (napr. Con A – pri modifikácii uhlíkovej elektródy zlatými nanočasticami a následne ich modifikáciu tiolovanými sacharidmi), resp. využiť aj iné typy prevodníkov ako zlaté povrchy. Príkladom môže byť GC („glassy-carbon“ – sklený uhlík) elektróda, elektrochemicky aktivovaná a modifikovaná thionínom, a následne inkubovaná s dopamínom vytvárajúcim na upravenom povrchu polydopamínový film. Na takto upravenú elektródu je už možné uchytiť Con A pre detekciu glukózy (tzv. Michaelova adícia)⁴⁸.

5. Záver

Jednou z dominantných oblastí analytickej chémie je v súčasnosti analýza komplexných biologických vzoriek za účelom skoršej diagnostiky niektorých ochorení, pričom táto problematika v sebe integruje viaceré oblasti súčasnej vedy, ako sú biotechnológie, biofyzika či mikroelektronika. Na to je potrebné vyvinúť citlivé, vysoko účinné a vysoko špecifické metódy. Veľmi perspektívnou oblasťou analýzy biomolekúl je práve analýza glykánových štruktúr, v súčasnosti súvisiaca aj s rozvojom lektinomiky. Lektíny schopné špecificky interagovať s určitými sacharidickými štruktúrami sú vhodným nástrojom pre vývoj moderných technológií a zariadení pre laboratornú klinickú diagnostiku, vrátane lektínových biosenzorov.

Táto publikácia bola vytvorená v rámci projektu VEGA 2/0127/10.

LITERATÚRA

1. <http://www.goldbook.iupac.org>, stiahnuté 15.7.2011.
2. Voet D. J., Voet J. G., Pratt C. W.: *Principles of Biochemistry*, 3. vyd. J. Wiley, Hoboken 2008.
3. Nilsson C. L. (ed.): *Lectins, Analytical Technologies*. Elsevier, Oxford 2007.
4. Novák M.: Chem. Listy 101, 872 (2007).
5. Heřmanová V., Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 100, 495 (2006).
6. Well L., Hart G. W.: FEBS Lett. 546, 154 (2003).
7. Gabius H.-J., André S., Kaltner H., Siebert H.-C.: Biochim. Biophys. Acta 1572, 165 (2002).
8. Katrlík J., Škrabana R., Mislovičová D., Gemeiner P.: Colloids Surf., A 382, 198 (2011).
9. Gemeiner P., Mislovičová D., Tkáč J., Švitel J., Pátoprstý V., Hrabárová E., Kogan G., Kozár T.: Biotech. Adv. 27, 1 (2009).
10. Minyong L., Lin N., Huang Z., Du L., Altier C., Fang H., Wang B.: J. Am. Chem. Soc. 130, 12636 (2008).
11. Yan J., Fang H., Wang B.: Med. Res. Rev. 25, 490 (2005).
12. Zhang X., Ju H., Wang J.: *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications*. Academic Press, Oxford 2008.
13. Katrlík J., Švitel J., Gemeiner P., Kozár T., Tkáč J.: Med. Res. Rev. 30, 394 (2010).
14. Mislovičová D., Gemeiner P., Kozarova A., Kozár T.: Biologia 64, 1 (2009).
15. <http://www.pdb.org>, stiahnuté 15.7.2011.
16. <http://www.sigmaaldrich.com>, stiahnuté 15.7.2011.
17. <http://www.biocompare.com>, stiahnuté 15.7.2011.
18. Kaku H., Peumans W. J., Goldstein I. J.: Arch. Biochem. Biophys. 277, 255 (1990).
19. Rahaie M., Kazemi S. S.: Biotechnol. 9, 428 (2010).
20. Cunningham S., Gerlach J. Q., Kane M., Joshi L.: Analyst 135, 2471 (2010).
21. Katre U. V., Gaikwad S. M., Bhagyawant S. S., Deshpande U. D., Khan M. I., Suresh C. G.: Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun. 61, 141 (2005).
22. Menghi G., Materazzi G.: Histol. Histopathol. 9, 173 (1994).
23. Thompson R., Creavin A., O'Connell M., O'Connor B., Clarke P.: Anal. Biochem. 413, 114 (2011).
24. Drake P. M., Schilling B., Niles R. K., Braten M., Johansen E., Liu H., Lerch M., Sorensen D. J., Li B., Allen S., Hall S. C., Witkowska H. E., Regnier F. E., Gibson B. W., Fisher S. J.: Anal. Biochem. 408, 71 (2011).
25. Vařilová T.: Chem. Listy 99, 570 (2005).
26. Durand G., Seta N.: Clin. Chem. 46, 795 (2000).
27. Rensburg S. J., Berman P. A., Potocnik F. C. V., Taljaard J. J. F.: Metab. Brain Dis. 15, 243 (2000).
28. Drake P. M., Cho W., Li B., Prakobphol A., Johansen E., Anderson N. L., Regnier F. E., Gibson B. W., Fisher S. J.: Clin. Chem. 56, 223 (2010).
29. Gabor F., Bogner E., Weissenboeck A., Wirth M.: Adv. Drug Deliv. Rev. 56, 459 (2004).
30. Kelly L. S., Birken S., Puett D.: Mol. Cell Endocrinol. 260, 33 (2007).
31. Hrubý M., Kučka J., Kozempel J., Lebeda O.: Chem. Listy 100, 10 (2006).
32. Bies C., Lehr C. M., Woodley J. F.: Adv. Drug Deliv. Rev. 56, 425 (2004).
33. Skládal P., Macholán L.: Chem. Listy 91, 105 (1997).
34. Labuda J., Oliveira Brett A.-M., Evtugyn G., Fojta M., Mascini M., Ozsoz M., Palchetti I., Paleček E., Wang J.: Pure Appl. Chem. 82, 1161 (2010).
35. Davis J. J., Tkáč J., Laurenson S., Ferrigno P. K.: Anal. Chem. 79, 1089 (2007).
36. Davis J. J., Tkáč J., Humphreys R., Buxton A. T., Lee T. A., Ferrigno P. K.: Anal. Chem. 81, 3314 (2009).
37. Švitel J., Dzgoev A., Ramanathan K., Danielsson B.: Biosens. Bioelectron. 15, 411 (2000).
38. Xue Y., Ding L., Lei J., Ju H.: Biosens. Bioelectron. 26, 169 (2010).
39. Nagaraj V. J., Aithal S., Eaton S., Bothara M., Wiktor P., Prasad S.: Nanomedicine 5, 369 (2010).
40. Szunerits S., Niedziolka-Jönsson J., Boukherroub R., Woisel P., Baumann J.-S., Siriwardena A.: Anal. Chem. 82, 8203 (2010).
41. Wang J.: *Analytical Electrochemistry*, 3. vyd. J. Wiley, Hoboken 2006.
42. Xi F., Gao J., Wang J., Wang Z.: J. Electroanal. Chem. 656, 252 (2011).
43. Chen H., Xi F., Gao X., Chen Z., Lin X.: Anal. Biochem. 403, 36 (2010).
44. Oliveira M. D. L., Nogueira M. L., Correia M. T. S., Coelho L. C. B. B., Andrade C. A. S.: Sens. Actuators, B 155, 789 (2011).
45. Oliveira M. D. L., Correia M. T. S., Coelho L. C. B. B., Diniz F. B.: Colloids Surf., B 66, 13 (2008).
46. Oliveira M. D. L., Correia M. T. S., Diniz F. B.: Biosens. Bioelectron. 25, 728 (2009).
47. Min I.-H., Choi L., Ahn K.-S., Kim B. K., Lee B. Y., Kim K. S., Choi H. N., Lee W.-Y.: Biosens. Bioelectron. 26, 1326 (2010).
48. Li F., Feng Y., Yang L., Li L., Tang C., Tang B.: Biosens. Bioelectron. 26, 2489 (2011).

T. Bertók, J. Šefčovičová, P. Gemeiner, and J. Tkáč (*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*): **Lectinomics: A Tool in Clinical Diagnostics**

This review gives the main characteristics of mostly commercially available lectins, including their specificity and practical aspects. Various methods, often routinely used, are described, including manufacture of lectin-based biosensors. Other laboratory techniques, mostly for biomedical purposes (such as glycodecode decoding, detection of pathogens and antibodies) and their applications in early diagnostics using the array formats are also mentioned.