

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2011

JOSEFÍNA LAMAČOVÁ

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**Studium molekulárních interakcí pomocí optických biosenzorů
a jejich využití pro vývoj nových léčiv**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Josefína Lamačová

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.
Školitel specialista: Doc. Ing. Jiří Homola, CSc., DSc.

Studijní program: Zdravotnická bioanalytika

Hradec Králové

2011

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové dne 29.7. 2011

Podpis:

Obsah	4
Poděkování	5
1.Úvod.....	6
2. Teoretická část.....	7
2.1. Biosenzory a jejich druhy.....	7
2.1.1. Optické biosenzory s povrchovými plasmony (SPR).....	10
2.1.2. Bioreceptory a jejich imobilizace	12
2.1.3. SPR biosenzory – aplikace.....	14
2.1.4. Kvalita potravin a bezpečnost.....	15
2.1.5. Lékařská diagnostika.....	15
2.2 Antisensní oligonukleotidy	16
2.2.1. Mechanismus antisensních oligonukleotidů.....	16
2.2.2. Druhy antisensních oligonukleotidů.....	18
2.2.3. Antisensní oligonukleotidy v medicíně	21
3. Cíl práce.....	23
4. Experimentální část	24
5. Materiál a metody.....	24
6. Výsledky a diskuze.....	29
7. Závěr	33
8. Seznam zkratk.....	34
9. Literatura.....	35

PODĚKOVÁNÍ

Za odborné vedení, velkou ochotu a cenné rady bych chtěla především poděkovat svému školiteli Doc. Ing. Jiřímu Homolovi, CSc., DSc. a vedoucí bakalářské práce Doc.RNDr. Lence Skálové, Ph.D.

Děkuji svým kolegům z Oddělení optických senzorů Ústavu fotoniky a elektroniky AV ČR, v.v.i. za laskavou pomoc při realizaci této bakalářské práce, Mgr. Tomáši Špringerovi, Mgr. Markétě Bockové a Mgr. Haně Šípové .

Děkuji rodině a mému příteli Danielu Dvořákovi za podporu a trpělivost během studia.

1. ÚVOD

Studium biomolekulárních interakcí je důležitou součástí výzkumu v oborech jako je medicína, molekulární biologie, farmaceutický průmysl, potravinářství, klinická biochemie, apod. Cílem je zefektivnit možnou diagnózu, vyvinout nové léky a rozkrýt námi dosud nepoznané molekulární pochody, které by vedly k rychlejší detekci jak chemických tak biologických látek. Dnešní doba vyžaduje rychlou a přesnou detekci látek.

Tématem bakalářské práce je studium molekulárních interakcí pomocí optických biosenzorů a jejich využití pro vývoj nových léčiv, v tomto případě antisensních léčiv. Pro realizaci této práce byla použita metoda rezonance povrchových plasmonů, která umožňuje detekovat interakce biomolekul. Tato metoda rezonance povrchových plasmonů byla vyvinuta v Ústavu fotoniky a elektroniky AVČR, v.v.i. vědeckým výzkumným týmem Doc. Ing. Jiřího Homoly, CSc., DSc. V rámci této práce byla pozorována hybridizace komplementárních oligonukleotidů v reálném čase, které se používají v rámci mnoha výzkumů antisensní terapie.

Bakalářská práce je rozdělena do dvou částí – rešeršní a experimentální. Rešeršní část obecně popisuje biosenzory, představuje jejich historii a principy, na kterých jsou tyto přístroje založeny a uvádí zde jejich rozdělení. Vzhledem k tomu, že v našem ústavu UFE AVČR, v.v.i. se zabýváme optickými biosenzory, je tato práce v dalších částech soustředěna pouze na tento typ biosenzorů. Zde je detailně popsán z pohledu konstrukce, principu funkce a možnosti využití. Další část pojednává o antisensních oligonukleotidech. Antisensní oligonukleotidy jsou zde předkládány jako možné terapeutikum, které na základě mnoha výzkumů bude v budoucnu možné využít jako léčivo, které zabrání vzniku různých druhů onemocnění zapříčiněných například genovou dysregulací, tvorbou nádorových onemocnění na základě nekontrolovaného dělení buněk či dokáže zamezit přenosu virových nákaz. V rámci experimentální části bakalářské práce byl vyzkoušen optický biosenzor s povrchovými plasmony pro sledování hybridizace antisensních nemodifikovaných i modifikovaných oligonukleotidů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. BIOSENZORY A JEJICH DRUHY

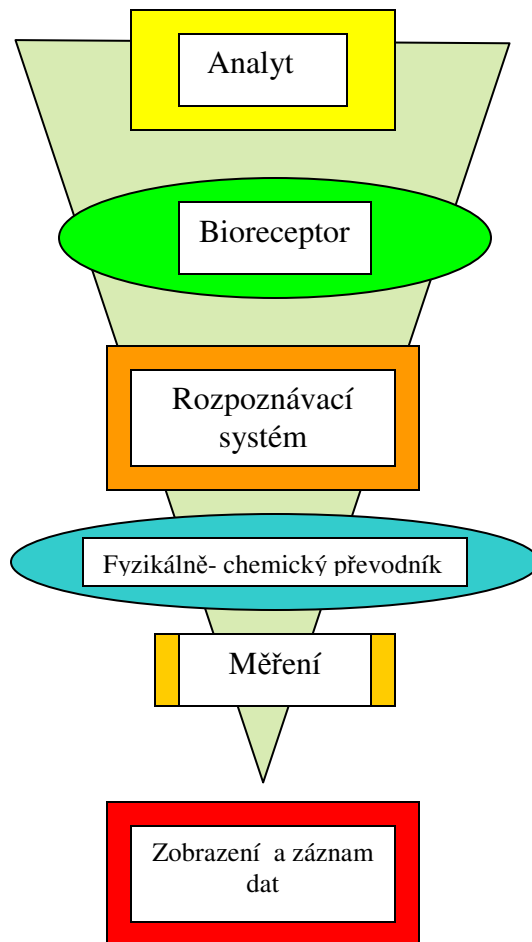
Podle definice IUPAC je biosenzor integrované zařízení, které převádí fyzikální, chemickou nebo biologickou veličinu na vhodný výstupní signál a poskytuje tak specifickou kvantitativní nebo semikvantitativní analytickou informaci. Biosenzor je zpravidla tvořen dvěma základními prvky: biologickým rozpoznávacím systémem neboli receptorem a fyzikálně chemickým převodníkem (viz obr. 1) [1].

První zmínka o biosenzoru se objevila v článku L. C. Clarka z roku 1956 [4] o použití kyslíkové elektrody pro detekci úbytku kyslíku.

Podle typu receptoru dělíme biosenzory na biokatalytické nebo bioafinitní. Biokatalytické biosenzory využívají přeměny analytu v průběhu chemické reakce a analyt je zároveň substrátem samotné enzymové reakce. Jako receptory slouží enzymy, organely, buňky nebo tkáně. Druhou skupinu tvoří bioafinitní biosenzory, kde je analyt specificky vázán na receptory. Jako receptory se převážně používají nukleové kyseliny nebo protilátky [2, 3].

Podle metody transformace chemického signálu na fyzikální, tedy podle typu použitého fyzikálně chemického převodníku, dělíme biosenzory na elektrochemické, optické, piezoelektrické, akustické a kalorimetrické.

V dnešní době se biosenzory využívají v oblastech jako je farmakologie a medicína, monitorování životního prostředí, potravinářský průmysl apod. [5].



Obr.1: Schématické znázornění biosenzoru.

Elektrochemické biosenzory využívají různé elektrochemické principy, podle nichž se dělí na potenciometrické, amperometrické, impedimetrické, piezoelektrické a kalorimetrické.

Roku 1975 firma Springs Instruments (Yellow Springs, OH, USA) uvedla na trh první komerčně vyrobený elektrochemický biosenzor. Toto zařízení se stalo pomocníkem rychlého stanovení glukosy u diabetiků. V současné době jsou dostupné komerční biosenzory, které umožňují detekovat několik látek zároveň.

Potenciometrické biosenzory jsou založeny na principu měření pomocí referenční a měřicí elektrody. Základem je změna potenciálu, která je vyvolaná akumulací náboje na rozhraní elektrody s roztokem [7]. Receptor je imobilizovaný na vnějším povrchu nebo uvnitř elektrody. Příkladem může být pH elektroda s ukotvenou glukosooxidasou. Glukosa samotná má na pH jen minimální vliv, ale po stránce enzymatické dochází k tvorbě glukonátu, který způsobuje acidifikaci. V minulosti byla skleněná pH elektroda používána jako fyzikální senzor. V dnešní době se pH elektrody používají při zjišťování pH roztoků.

Amperometrické biosenzory poskytují jako výstupní signál proud, který vzniká elektrochemickou reakcí při konstantním napětí pracovní elektrody. Tento proud je úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Amperometrické biosenzory jsou poměrně citlivé a pro detekci většího počtu vzorků vhodnější než biosenzory potenciometrické. Pracovní elektroda amperometrického biosenzoru je obvykle tvořena z ušlechtilého kovu na němž jsou ukotveny receptory [8].

Elektrochemická impendanci spektroskopie (EIS) je elektrochemická analýza založená na odezvě elektrody na vložený napěťový nebo proudový signál o malé amplitudě při různých frekvencích [9]. Impendanci systémem lze skenovat široký rozsah frekvencí střídavého proudu. Impendanci spektra slouží pro charakterizaci různých biomolekulárních vzorků [10].

Koncem 19. století byl objeven piezoelektrický jev. Tento jev se vyskytuje u krystalů, které mají schopnost generovat elektrické napětí při jejich deformaci. Vyskytuje se pouze u takových krystalů, které nemají střed symetrie. Nejznámější je monokrystalický křemen (křišťál).

Tento druh biosenzorů patří v dnešní době k nejcitlivějším a měří úhrou hmotnost molekul, které jsou zachycené na povrchu.

Každý krystal má přirozenou vibrační frekvenci. Vibrací vzniká oscilující elektrické pole o stejné frekvenci. Pokud je piezoelektrický krystal zapojen do oscilujícího obvodu, začne vibrovat. Stabilní vibrace však nastává pouze při přirozené rezonanční frekvenci, kdy je umožněn efektivní přenos energie z elektrického pole. Specifičnost stanovení je dosažena ukotvením vhodného bioreceptoru na povrch krystalu [11, 12].

Piezoelektrické biosenzory se využívají především v medicíně jako imunosenzory pro měření koncentrace antigenů, ale také se jimi testují materiály, ze kterých se vyrábí kloubní náhrady a kde je důležité, aby byl materiál biokompatibilní. Z komerčního hlediska jsou piezoelektrické biosenzory cenově dostupnější než optické biosenzory.

Kalorimetrické biosenzory využívají změny teplot v průběhu biochemických reakcí. Převodníkem je obvykle termistor, jehož odpor závisí na teplotě [13].

Vzhledem k tomu, že nelze přesně určit, kolik tepla bylo uvolněno (např. část tepla se spotřebuje zářením), má tento typ biosenzorů svá omezení.

Princip optických biosenzorů je založen na interakci světelného záření s hmotou. Detekuje se změna vlastností světelného záření jako následek biochemické reakce odehrávající se na povrchu biosenzoru. Pomocí optického převodníku detekujeme například koncentrace látky zachycené na povrchu senzoru. Technikami optických biosenzorů (reflexní, absorpční spektroskopie, fluorescence, luminiscence apod.) a jejich možnostmi se v přehledovém článku zabýval např. Jeremy J. Ramsden [14].

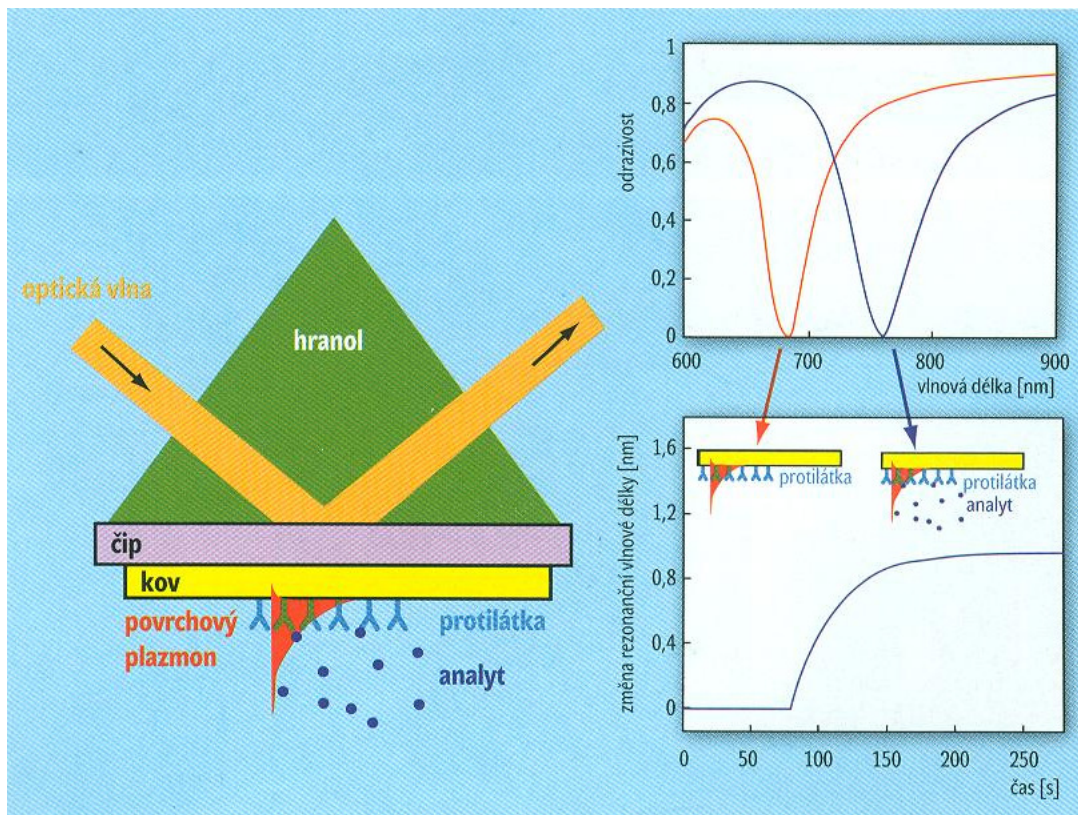
Podle principu optického převodníku dělíme optické biosenzory na absorpční, interferometrické, luminiscenční a sensory založené na spektroskopii vedených vln. Sensory, které jsou založeny na spektroskopii vedených vln a interferometrické sensory patří mezi tzv. bezznačkové biosenzory (label-free). Vzhledem k tomu, že tato zařízení ke stanovení analytu nepotřebují žádné značící molekuly jako jsou například fluorescenční či radioaktivní molekuly k detekci signálu, je tato metoda i z finančního hlediska velmi výhodná.

2.1.1. OPTICKÉ BIOSENZORY S POVRCHOVÝMI PLASMONY

Optické biosenzory založené na excitaci povrchových plasmonů (SPR, z *angl. Surface plasmon resonance*) jsou jedním z hlavních typů senzorů založených na spektroskopii vedených vln.

Biosenzory založené na rezonanci povrchových plasmonů detekují změny indexu lomu v těsné blízkosti povrchu senzoru. Povrchové plasmony jsou excitovány světelnými vlnami a šíří se na rozhraní kov-dielektrikum. Takto vzniklé evanescentní pole sonduje biomolekuly u povrchu senzoru. Změna indexu lomu v blízkosti povrchu senzoru (např.

vazbou analytu) vede ke změně šíření povrchového plasmonu, jež ovlivní charakteristiku odražené světelné vlny, která s tímto povrchovým plasmonem souvisí. Touto charakteristikou je např. rezonanční vlnová délka. Nedílnou součástí SPR biosenzorů je vrstva receptorů uchycených k povrchu senzoru schopných interagovat s vybraným analytem a SPR optický převodník, který překládá interakci receptorů s analytem na výstupní signál. Molekuly zkoumaného analytu jsou k povrchu senzoru přiváděny v roztoku a dostávají se do kontaktu s imobilizovanými receptory. Při navázání molekuly analytu na pevně ukotvené receptory dojde ke zvýšení indexu lomu v blízkosti povrchu. Tato změna je zaznamenána a vyhodnocena (Obr.2.).



Obr.2: Excitace povrchového plasmonu metodou totálního tlumeného odrazu, spektrum odraženého světla s charakteristickým zářezem a odezva biosenzoru na záchyt analytu (převzato[40])

Poprvé byly povrchové plasmony pozorovány roku 1902 Woodem, který popsal anomálie ve spektru ohýbaného světla na kovové difrakční mřížce. Tyto anomálie byly prokázány v souvislosti s excitovanými elektromagnetickými povrchovými vlnami na povrchu difrakční mřížky [17]. Povrchovými plasmony na planárních strukturách se zabývali Otto, Kretschmann a Raether, kteří svými průkopnickými pracemi vyvinuli vhodnou metodu pro excitaci povrchových plasmonů, jejich detekci a použití této metody v moderní optice. O základech se dá dočíst ve velkém množství knih a odborných publikací [17, 18].

Na počátku 80-tých let pomocí SPR senzorů proběhla první studie týkající se procesů na povrchu kovů a detekce plynů [15]. Od té doby SPR biosenzory prošly velkým rozvojem jak v oblasti technologie tak na poli jejich aplikací. Dnes se tento obor řadí mezi ty s největším počtem odborných publikací a to nejen v odborných člancích, ale o technologii SPR biosenzorů byla vydaná i řada monografií [16].

2.1.2. BIORECEPTORY A JEJICH IMOBILIZACE

V afinitních SPR senzorech byly aplikovány různé typy molekul, které zastávaly úlohu bioreceptorů. Nejčastěji používanými bioreceptory jsou protilátky, které jsou oblíbené díky své vysoké afinitě, selektivitě a protože jsou komerčně lépe dostupné než jiné typy biomolekul [19]. Dalším typem bioreceptorů jsou peptidy. V porovnání s protilátkami jsou peptidy levnější [20]. Velký význam v souvislosti s detekcí pomocí SPR biosenzorů mají nukleové kyseliny DNA (deoxyribonukleová kyselina) RNA (ribonukleová kyselina). DNA je polymerní řetězec vznikající polymerací nukleotidů. V buňkách se vyskytuje ve formě dimeru tvořeného antiparalelně uspořádanými řetězci s komplementárním bázevým složením. RNA se zásadně vyskytuje jako jednovláknová, ale může vytvářet lokální interní dvoušroubovice a stabilizovat se ve složité prostorové struktury. RNA molekuly se účastní v procesu exprese genetické informace ve čtyřech rolích, jsou nositeli informace pořadí aminokyselin (mRNA – informační), jsou stavebními jednotkami ribozomu (rRNA – ribozomální), jsou přenašeči aminokyselin při syntéze proteinů na ribozom (tRNA– transferová) a krátké úseky RNA se účastní tzv. post-transkripčních úprav. V nedávné době se perspektivním typem bioreceptorů pro SPR

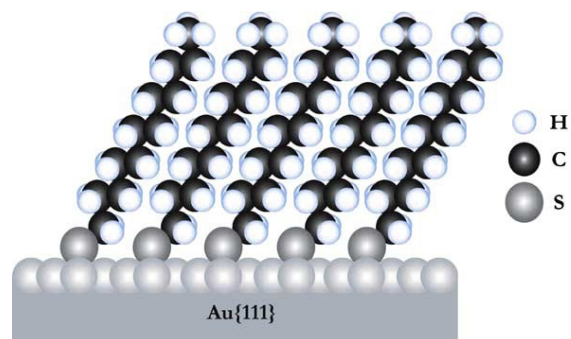
ukázaly být tzv. aptamery. DNA a RNA aptamery jsou jednovláknové oligonukleotidové sekvence, které se syntetizují k detekci analytů jako jsou malé molekuly, bílkoviny, nukleové kyseliny a dokonce i buňky, tkáň nebo organismy. Navíc samotná syntéza aptamerů je jednoduchá a reprodukovatelná [21].

Hlavní postupy k imobilizaci molekul na SPR senzorech jsou založeny na fyzikální absorpci, hydrofobních a elektrostatických interakcích a kovalentních vazbách.

Při imobilizaci bioreceptorů je největší důraz kladen na způsob jejich uchycení k povrchu senzoru. Imobilizační metoda by měla být navržena tak, aby se na povrchu senzoru uchytilo dostatečné množství bioreceptorů a zároveň, aby se minimalizovaly nespecifické vazby k povrchu. Samotné receptory musí být navázány tak, aby nebyla narušena či pozměněna jejich biologická aktivita.

Molekuly mohou být navázány na povrch senzoru v jedné nebo ve dvoudimenzionální vrstvě. Ukotvení na povrchu senzoru je manipulačně jednodušší, avšak příliš vysoká hustota imobilizovaných bioreceptorů může vést k nižší odezvě a to z důvodu stérické překážky jednotlivých molekul [17].

Nejčastěji používanou metodou je tvorba homogenní vrstvy alkanthiolů či disulfidů tzv. samoorganizující se vrstvy [18]. Tato vrstva se tvoří samovolně při kontaktu zlata a uhlovodíkového řetězce, prostřednictvím molekuly síry a disperzních sil se sami uspořádají do kompaktní monomolekulární vrstvy (Obr. 3).



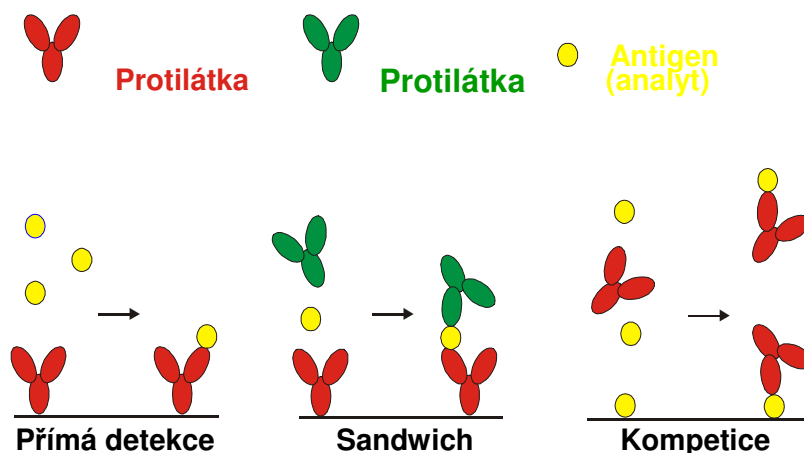
Obr.3: Struktura homogenní vrstvy alkanthiolů na zlatém substrátu (převzato z [22])

Alkylový zbytek tvoří většinou dlouhý nevětvený řetězec o 8-12 uhlících zakončený různými funkčními skupinami (např. –OH, –COOH). Pro optimální přípravu povrchu se používají směsi alkanthiolů s různými funkčními skupinami. Zatímco jeden typ alkanthiolů slouží k ukotvení receptorů, jiné tvoří pozadí, které má schopnost do jisté míry blokovat nespecifické vazby na povrchu senzoru, což by znamenalo, že by se na povrch senzoru mohly navázat jiné druhy molekul, které nejsou cílem detekce [23].

2.1.3. SPR BIOSENZORY – APLIKACE

SPR biosenzory mají potenciál pro využití v oblastech jako jsou lékařská diagnostika a monitorování životního prostředí nebo kontrola kvality potravin. Během posledních několika desetiletí rozvoj biosenzorů vedl k úspěšnějším detekcím biomolekul a jejich interakcím.

Na SPR senzorech byly vyzkoušeny různé formy detekcí jak chemických tak biologických analytů. Forma detekce je vybrána dle velikosti cílového analytu, na základě vlastností detekovaných biomolekul, rozsahu koncentrací, který má být měřen a na základě vzorku [24]. Podle těchto kritérií se zvolí vhodný detekční formát (Obr.4.)



Obr.4: Příklady detekčních formátů používaných pro SPR afinitní biosenzory.

Přímá detekce se používá u středně velkých a velkých analytů, metoda detekce zvaná sandwich je vhodná pro malé a středně velké analyty přítomné v malých koncentracích a nepřímá detekce (kompetice, inhibice) je využívána pro malé analyty v nízkých koncentracích.

2.1.4. KVALITA POTRAVIN

SPR biosenzory se staly pomocníky při zjišťování kvality potravin a při analýzách zjišťujících kvalitu a nezávadnost [25]. Cílem detekce jsou patogeny jako bakterie, protozoa, houby a paraziti (např. *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* či *Staphylococcus aureus*) a jimi produkované toxiny [17], ale také chemické kontaminanty.

2.1.5. LÉKAŘSKÁ DIAGNOSTIKA

Cílem dnešní moderní bioanalytiky je rychlá, citlivá a specifická detekce biomarkerů, která indikuje normální biologické procesy, patogenní procesy nebo farmakologické odezvy na danou terapii.

SPR senzory se osvědčily při detekci analytů souvisejících s lékařskou diagnostikou jako jsou rakovinové markery, markery detekující ischemická onemocnění a onemocnění kardiovaskulárního systému, uplatnily se při detekci protilátek, léků, hormonů a mnoha dalších [17].

2.2. ANTISENSNÍ OLIGONUKLEOTIDY

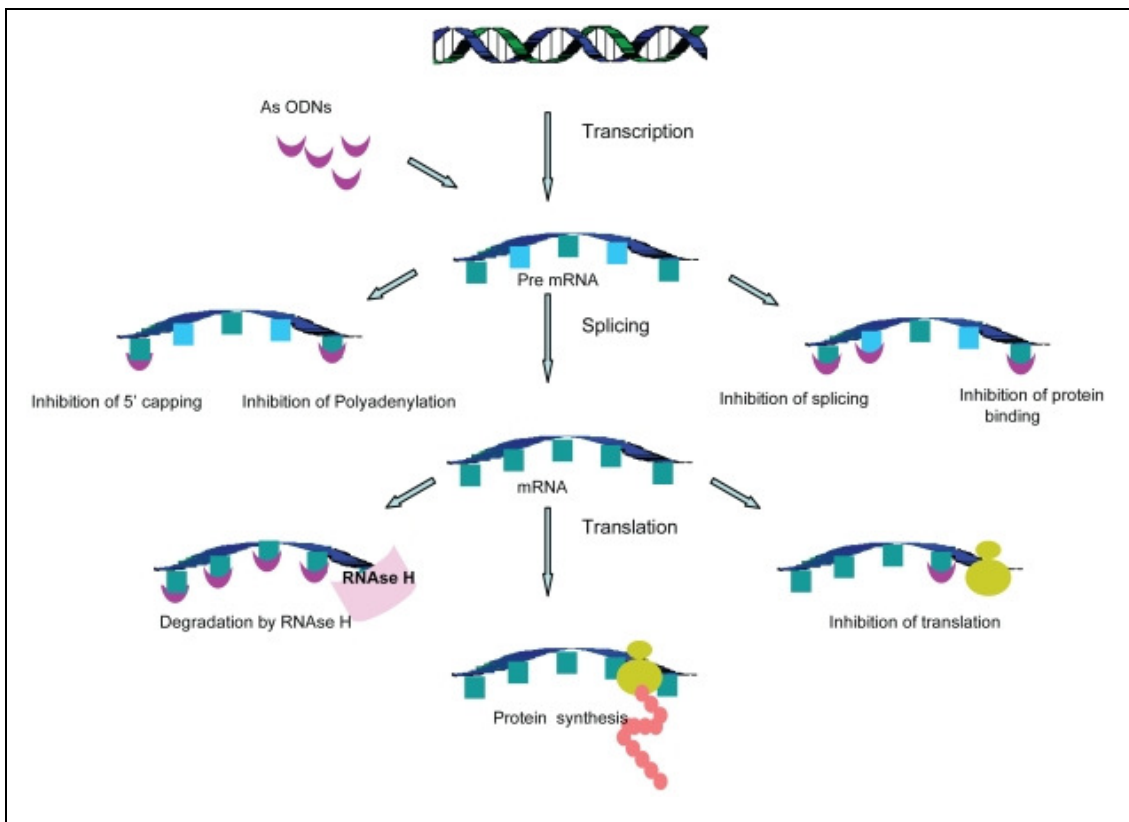
Antisensní oligonukleotidy (AON) jsou jednořetězcová vlákna nukleových kyselin, dlouhá přibližně 18-21 nukleotidů, která se specificky vážou na komplementární cílovou sekvenci messenger RNA (mRNA), tomuto procesu se říká hybridizace. Navázáním antisensního oligonukleotidu na messenger RNA (mRNA) dochází k ukončení translace genetické informace z mRNA na protein nebo dojde k aktivaci RNasy H, která mRNA rozštěpí.

Přírodní oligonukleotidy se v biologických systémech působením nukleás (RNasy, DNasy) velmi rychle rozštěpí, tím se výrazně omezuje jejich použití, proto bylo nutno vyvinout modifikované oligonukleotidy, které jsou podstatně stabilnější a odolnější vůči nukleásám.

Poprvé demonstroval použití antisensní strategie roku 1977 Patersonem a spol, kdy použil sekvenci DNA v buněčné kultuře [26]. Téměř o rok později Zamecnik a Stephenson prokázali v kultuře kuřecího fibroblastického vzorku obsahujícího Rous Sarkom virus, že syntetický 13-mer oligonukleotidu byl komplementární k terminálnímu konci 3' konce sekvence Rous Sarkom viru. Navázání syntetického oligonukleotidu vedlo k inhibici replikace viru a transformaci ve fibroblastu sarkomových buněk [27]. Tak došlo k prvnímu návrhu AON pro terapeutické účely.

2.2.1. MECHANISMY PŮSOBENÍ ANTISENSNÍCH OLIGONUKLEOTIDŮ

Antisensní oligonukleotidy mohou ovlivnit expresi genu na mnoha úrovních jako je uzavření 5' konce, polyadenylace, intron-exon sestřih, jaderný export, cytoplazmatické stabilizace a vazba na ribozomy. Všechny tyto kroky jsou pro syntézu a funkci mRNA klíčové. Zásah do těchto procesů může zastavit translaci mRNA na protein. Celkový přehled možných mechanismů antisensních oligonukleotidů znázorňuje Obr. 5.



Obr.5.: Mechanismus účinku antisensních oligonukleotidů (převzato z [28])

Jak bylo výše zmíněno, antisensní oligonukleotidy mohou aktivovat RNasu H a zabránit tím syntéze proteinu. RNasa H je nespecifická endonukleáza, která štěpí 3'fosfodiesterovou vazbu v duplexu RNA/DNA, je schopna degradovat jakoukoliv RNA, pokud je hybridizovaná s DNA. Navázáním antisensního oligonukleotidu tak vznikne na mRNA lokální hybridní duplex, který syntézu proteinů zablokuje nebo dokonce při navázání enzymu RNasy H na tento duplex molekulu mRNA zcela degraduje [29].

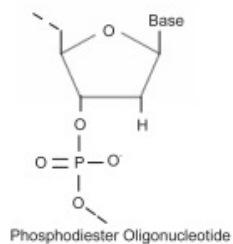
AON, které nejsou schopné aktivovat RNasu H, se zaměřují svými účinky na posttranskripční kroky syntézy mRNA [28] nebo na kroky, které brání stabilizaci samotné mRNA. Jedním z důležitých posttranskripčních kroků je sestřih mRNA, kdy dojde k odstranění nekódujících částí RNA tzv. intronů. V případě navázání antisensního oligonukleotidu na klíčovou sekvenci mRNA dojde k zabránění sestřihu a tím i inhibici vzniku proteinu [30]. Dalším mechanismem, kterým AON mohou regulovat expresi mRNA je inhibice syntézy mRNA, kdy se komplementární vlákno naváže na mRNA, což má též za následek blokádu syntézy proteinů [31].

Mechanismus, který zajistí destabilizaci samotné mRNA, je zaměřen na kroky syntézy mRNA, které jsou nezbytné ke stabilizaci, např. uzavření 5' a 3' konce polyadenylací mRNA. Proto jsou oligonukleotidy navrženy proti oblasti 5' nebo 3' konci pre-mRNA, kde může dojít k jejímu uzavření nebo polyadenylaci, což způsobí degradaci mRNA buněčnými enzymy [30].

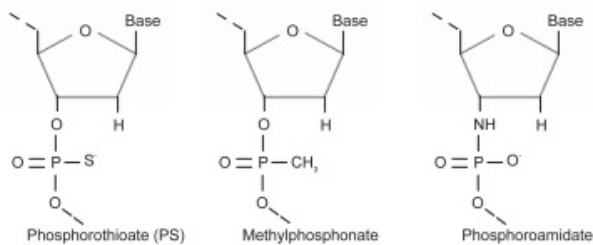
2.2.2. DRUHY ANTISENSNÍCH OLIGONUKLEOTIDŮ

Počáteční studie AON využívaly deoxyribonukleotidy. Výsledky však byly neuspokojivé. Hlavní faktory neúspěchu byly nízká prostupnost přes biologické membrány, rychlá degradace pomocí endo- a exonukleas apod. [32]. Tyto faktory vedly k chemické modifikaci oligonukleotidů. Ideální antisensní oligonukleotidy by se mohly užívat jako terapeutika, měly by však splňovat následující kritéria: dostatečnou stabilitu vůči enzymům v buňce, které štěpí nukleové kyseliny, měly by mít specifickou afinitu k cílovému úseku přirozené nukleové kyseliny s komplementární bázovou sekvencí, schopnost aktivovat RNasu H, musí být zajištěn jejich úspěšný průnik do buňky a správná distribuce ve vnitřním prostředí buňky, nesmějí mít toxický účinek.

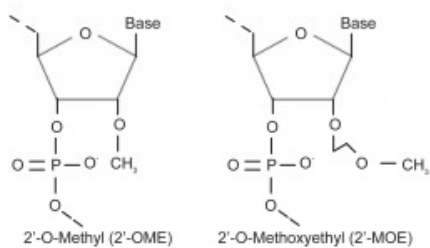
Základní modifikace AON jsou rozděleny do tří generací podle místa modifikace (Obr.5). Jsou to antisensní oligonukleotidy s modifikovanou ribofosfátovou kóstrou, modifikovanými cukernými složkami a bázemi.



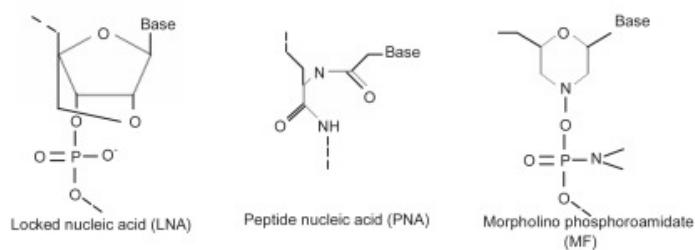
FIRST GENERATION ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES



SECOND GENERATION ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES



THIRD GENERATION ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES



Obr.6: Struktura první, druhé a třetí generace antisensních oligonukleotidů
(převzato z [28]).

První generace antisensních oligonukleotidů je založena na fosforothioátech, které zvyšují odolnost vůči nukleázám. Výhodami AON první generace je jejich záporný náboj, který zjednodušuje jejich přenos do buněk, schopnost aktivovat RNasu H [33]. Problémem první generace AON je jejich nespecifická vazba na nukleové kyseliny a proteiny. V klinických studiích se testuje mnoho preparátů na bázi oligonukleotidů první generace. Zatím jen jeden byl povolen k lékařskému použití – Vitravine, který patří mezi fosforothioátové oligonukleotidy. Tento lék se aplikuje při místním ošetření cytomegalovirového zánětu sítnice u pacientů s AIDS. Mechanismus působení Vitravinu je založen na inhibici proteosyntézy cytomegalovirového proteinu [28].

Ve druhé generaci AON došlo k alkylové modifikaci na druhé pozici ribosy, což vedlo k vysoké stabilitě s cílovou mRNA. Zároveň se zvýšila i rezistence vůči nukleázám, prodloužil se poločas rozpadu *in vivo* a snížila se toxicita.

Nejčastěji používané antisensní oligonukleotidy druhé generace jsou 2'-O-methyl (2'-OME) a 2'-O-methoxyethylen (2'-MOE) ODs. Bohužel pozitivní účinky těchto modifikací jsou sníženy tím, že 2'-OME a 2'-MOE neaktivují RNasu H [34]. Aby k aktivaci RNAsy H došlo byly vyvinuty chimerické AON. Ve středu těchto chimerických AON je fosforothioátový úsek a po krajích je 2'OME pro zvýšení stability duplexu AON a mRNA [35].

Příkladem AON druhé generace je GEM 231 a GEM 92 (Hybridon). V současnosti se tyto antisensní oligonukleotidy testují pro léčbu tzv. pevných nádoru a HIV [36].

AON třetí generace byly vyvinuty modifikací furanosového kruhu. Mají vyšší stabilitu v biologických tekutinách, jsou resistantní vůči degradaci nukleázami a vykazují silnou hybridizační afinitu k mRNA. Zároveň mají schopnost rozpoznat dvoušroubovici DNA a tím modulovat genovou expresi.

Třetí generace AON neaktivuje RNasu H. Jejich hlavním mechanismem je blokáce translace proteinů tzv. sterickým bráněním [37]. Představiteli této generace jsou AVI4557 inhibující cytochrom P450 a AVI 4126, který se testuje v rámci léčby restenozy, rakoviny a polycystické onemocnění ledvin [38].

2.2.3. ANTISENSNÍ OLIGONUKLEOTIDY V MEDICÍNĚ

V uplynulém desetiletí došlo k exponenciálnímu nárůstu užívání AON v *in vitro* a *in vivo* studiích, kde jsou AON zkoumány jako potenciální terapeutika proti rakovině, virovým infekcím, zánětlivým onemocněním a dalším chorobám. V současné době je v klinických studiích zkoumána účinnost více než 30-ti léčebných AON. Několik těchto preparátů je představeno níže v tabulce (Tab.1).

První lék v podobě antisensního léku byl zhotoven roku 1992 pro léčbu leukémie. Nicméně množství nežádoucích účinků při experimentech s AON vedlo k pochybnostem a následnému zamítnutí pro léčbu. Po následujících četných klinických studiích byl vyvinut další lék zvaný Vitravine (první generace) a to v souvislosti s léčbou cytomegalovirové retinitidy neboli zánětem sítnice způsobeným cytomegalovirem u pacientů s AIDS. Tento druh oligonukleotidu se podal přímo do sklivce a zabránil tak další replikaci cytomegaloviru v buňkách sítnice [39]. Tento lék se stal prvním lékem, který byl schválen U.S. Food and Drug Administration, což je institut pro kontrolu potravin a léčiv.

V současné době je věnována velká pozornost virovým onemocněním a cytopatickým účinkům AON. Klinická studie antisensní technologie byla prováděna například u herpes simplex viru (HSV), virus lidské imunodeficiency (HIV), cytomegaloviru (CMV), viru hepatitidy B (HBV), viru hepatitidy C (HCV), Epstein-Barrové viru (EBV) a u mnoho dalších [28].

Antisensní oligonukleotidy v klinických studiích

<u>AON</u>	<u>Společnost</u>	<u>mRNA</u>	<u>Chemie</u>	<u>Společnost</u>	<u>Klinická fáze</u>	<u>Testovaná Skupina onemocnění</u>
G3139 (Oblimersen)	Genta	Bcl-2	PS	Systemic	Fáze I,II,III	CLL, Maligní melanom, Mnohočetný myelom, NSCLC, AML
RESTEN-MP	AVI	c-myc	MF	Systemic	Fáze II	Restenóza
ISIS 2503	Isis	H-ras	PS	Systemic	Fáze II	NSCLC, Rakovina prsu, Kolorektální a pankreatický karcinom
LErafAON-ETU	NeoPharm	raf kinase	PS	Systemic	Fáze I	Pokročilé rakoviny
OGX-011	OncoGenex	Clusterin	Gapmer	Systemic	Fáze II	NSCLC, Rakovina prostaty a prsu
ISIS 3521 (Affinitak)	Isis/Eli Lilly	PKC α	PS	Systemic	Fáze III	NSCLC
GTI 2040	Lorus	Ribonucleotide reductase	PS	Systemic	Fáze II	Rakovina ledvin
LR3001	Genta	c-myc	PS	Systemic	Fáze I	CML
GEM 231	Hybridon	PKA	Gapmer	Systemic	Fáze I,II	Pevné nádory
MG98	Methylgene	DNA methyltransferase	Gapmer	Systemic	Fáze II	Metastázy hlavy, krku a ledvin
AP 12009	Antisense Pharma	TGF- β 2	PS	Intra tumoral	Fáze II	Glioma, maligní melanom, Rakovina slinivky břišní
ISIS 2302 (Alicaforsen)	Isis	ICAM-1	PS	Systemic/enema	Fáze II	Ulcerózní kolitida
EPI-2010	EpiGenesis	Adenosine A1R	PS	Aerosol	Fáze II	Astma
ISIS 104838	Isis	TNF- α	Gapmer	Subcutaneous	Fáze II	Revmatoidní artritida
GEM 92	Hybridon	HIV gag	Gapmer	Oral	Fáze II	HIV

Zkratky tabulky č.1:

As-ODN - antisensní oligonukleotidy
 PKC α - protein kinasa C α
 PAK - protein kinasa A
 TGF- β 2 - transformující růstový faktor β -2
 ICAM-1 - intracelulární adhezní molekula-1
 Adenosine A1R- adenosine A1 receptor
 TNF α - tumor nekrotizující faktor α

HCV- hepatitida C virus
 HIV- human immunodeficiency virus
 PS - phosphorothioáty
 MF - morpholin
 CLL - chronická lymfatická leukémie
 NSCLC - nemalobuněčný karcinom
 AML - akutní myeloidní leukémie
 CML - chronická myeloidní leukémie

Tabulka č.1: Antisensní oligonukleotidy v klinických studiích (převzato z [28])

3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- 1) shromáždit dostupné informace o bioenzorech a možnostech jejich využití pro studium molekulárních interakcí, konkrétně pro sledování hybridizace komplementárních oligonukleotidů
- 2) vyzkoušet optický biosenzor pro sledování hybridizace vybraných sekvencí oligonukleotidů

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části bude popsána aplikace optického biosenzoru při sledování hybridizace komplementárních oligonukleotidů.

5. MATERIÁL A METODY

Chemikálie:

Ethanol (99%, Merci, Česká republika)

Q-voda (vodivost 0,05 uS / cm 25°C, přístroj Direct, Millipore, Francie)

Ethanol pro spektroskopie fa Merck p.a. 99,9 %

N₂ – bomba , p.a. 99,99999% (Linde, Česká republika)

Thioly (Prochimia, Polsko) - HS-C11-EG4 – M= 380,58g/mol

- HS-C11-EG6 – OCH₂ – COOH M= 526,73 g/mol

Pufry používané pro imobilizaci a odmytí streptavidinu a pro imobilizaci oligonukleotidů jsou následující:

SA - Sodium acetate buffer solution (10 mM, pH 5, Sigma Adrich, Česká republika)

PBNa - fosfátový pufr (10 mM, pH 7.4, složení : 137 mM NaCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 2.7 mM KCl, Sigma Aldrich, ČR)

PBS - fosfátový pufr (50 mM, pH 7.4 , složení : 137 mM NaCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 2.7mM KCl, Sigma Aldrich, ČR)

PBS** (poměr pufru PBNa a PBS 1:1)

Amine Coupling Kit (N- hydroxysuccinimide – NHS / 1-Ethyl -3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochlorid - EDC, BIACORE BA, Švédsko)

Streptavidin z streptomyces avidinii (50 mM, Sigma Aldrich, ČR)

sekvence biotinovaného oligonukleotidu E1: 5'-GTC CCC CTC TTT GGT CTT GC-3'

sekvence biotinovaného oligonukleotidu E4: 5'-TAT TAA CTT TAC TCC CTT CC-3'

sekvence komplementárních oligonukleotidů E1C: 3'- CAG GGG GAG AAA CCA GAA CG -5'

sekvence nekomplementárních oligonukleotidů E4C: 3'- ATA ATT GAA ATG AGG GAA GG-5' (Integrated DNA technologies inc., USA).

Sekvence biotinovaneho oligonukleotidu: 5'-(TEG)₂-C₇-rA₁₅-(CCA)₈ C-3'

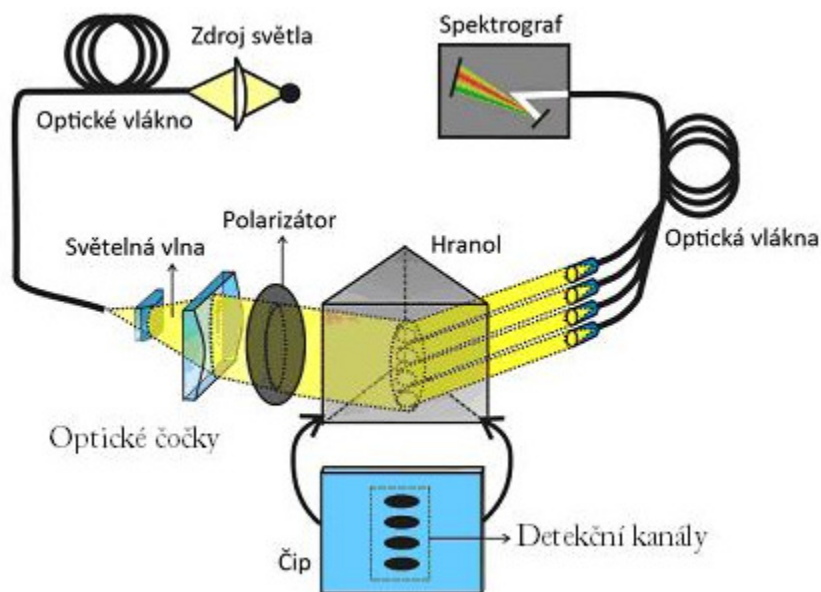
Sekvence referenčního oligonukleotidu dT15 : 5'- TTT TTT TTT TTT TTT -3'

Sekvence modifikovaného oligonukleotidu: 5'- T[^]TT TTT T[^]TT TTT T[^]TT - 3'(UOCHAB, ČR)

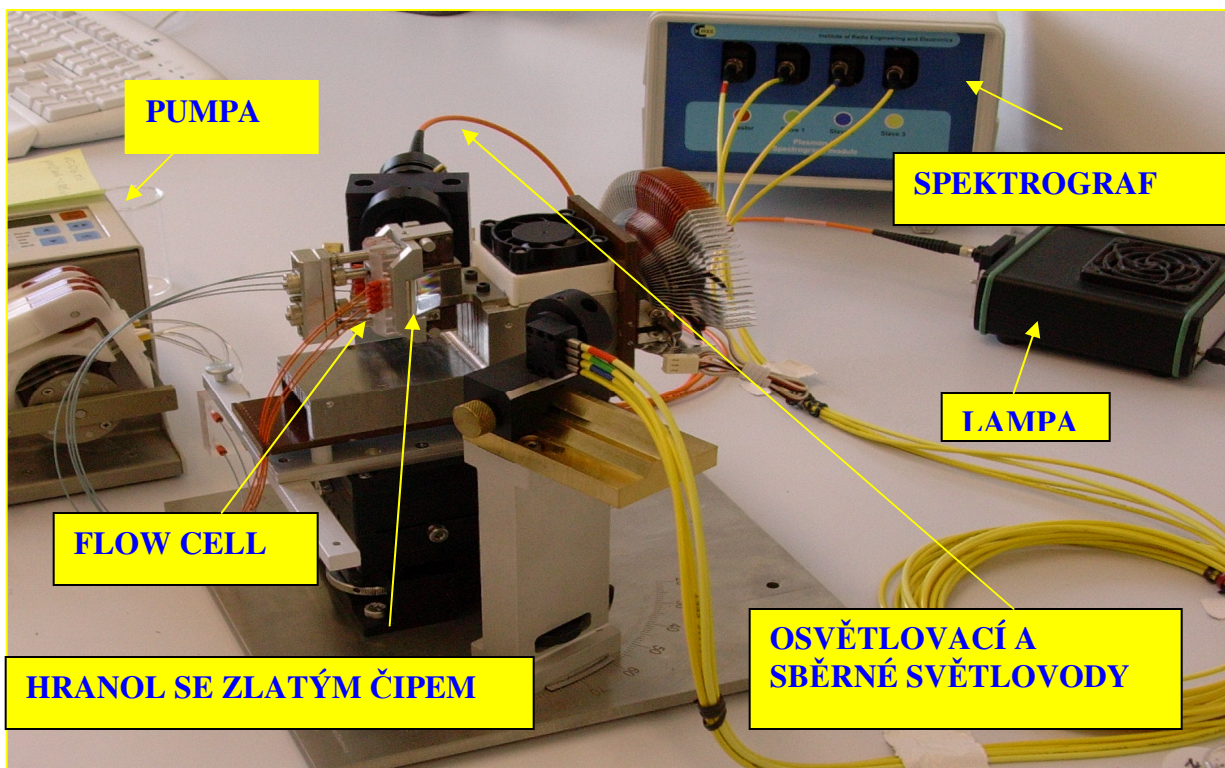
Čtyřkanálový SPR biosenzor

Čtyřkanálový SPR biosenzor byl vyvinut v Ústavu fotoniky a elektroniky AVČR, v.v.i. v oddělení optických biosenzorů a je založen na spektroskopii povrchových plasmonů excitovaných pomocí optického hranolu. Plocha SPR senzoru byla tvořena skleněným čipem, na který byl pomocí napařování elektronovým svazkem nanesen titanový film o tloušťce 2 nm a zlatá vrstva o tloušťce 55 nm. Před následným krokem byly čipy opláchnuty ethanolem a Q-vodou a vloženy do UV-pece na 10 min, kde dochází k rozbití nežádoucích molekul na povrchu zlaté vrstvy. Po té byly opláchnuty opět ethanolem a Q-vodou a vysušeny dusíkem. Pro zajištění maximální čistoty se s čipy manipulovalo ve flow-boxech.

Takto ošetřený čip byl pomocí imerze přiložen k optickému hranolu, který byl přes něj osvětlen širokospektrálním světlem halogenové lampy, a to bylo před tím zkolimováno a polarizováno (Obr.7. a 8.)



Obr.7.: Schéma 4-kanálového SPR senzoru



Obr.8.: 4-kanálový SPR senzor

Na čip se po té přiložila destička z níž vedly čtyři izolované komůrky, kterými se vzorky v průběhu experimentu dopravovaly na plochu čipu. Dopravování vzorků a stability průtoku bylo zajištěno pomocí peristaltické pumpy (Reglo, Ismatech, Švýcarsko). Během experimentu byla teplota stabilizována teplotním stabilizátorem (ILX Lightwave, USA) na 25°C.

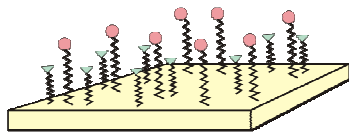
Na zlatém povrchu došlo k excitaci povrchového plasmonu (excitační vlnová délka okolo 750 nm). Ve spektru tak vznikl zářez, který odpovídal excitační vlnové délce plasmonu a odražené světlo se navázalo do čtyř optických vláken a jeho spektrum se vyhodnotilo čtyřkanálovým spektrografem. Vzniklá spektra se v reálném čase analyzovala pomocí speciálního softwaru SPR UP, který určil rezonanční vlnovou délku pro každý kanál (Obr.7).

Imobilizace oligonukleotidů

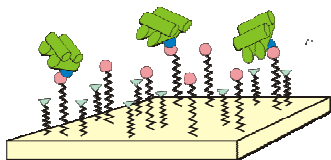
Prvním krokem imobilizace oligonukleotidů je funkcionalizace a to tím, že se nejprve zlaté čipy naložily do směsi alkanthiolů 200mM roztoků thiolů, které byly rozpuštěny v etanolu pro spektroskopii v poměru 3:7 (HS-C11-EG4 : HS-C11-EG6 – OCH₂ – COOH). Pro lepší navázání alkanthiolů se naložené čipy inkubovaly při 40°C po dobu 10 minut a následně se na dobu 24h vložily na tmavé místo a ponechaly při teplotě 25°C. Během těchto 24 h došlo k vytvoření homogenní vrstvy alkanthiolů. Výsledná monovrstva je tvořena silnými koordinacemi síry s kovem, doprovázené Van der Waalsovými silami mezi alkylovými řetězci. S dostatečně dlouhým řetězcem je výsledná monovrstva hustší a její struktura stabilnější. Delší thiole HS-C11-EG6 – OCH₂ – COOH sloužily k navázání streptavidinu pomocí peptidové vazby a kratší oligonukleotidy HS-C11-EG4 zakončené tetraethylglykolovou skupinou sloužily k zablokování možných vazebných míst na povrchu zlata a k zabránění vzniku nespecifických vazeb. Pro aktivaci karboxylových skupin bylo použito NHS a EDC, samotná aktivace probíhala na čipu, který byl vložen do senzoru.

Předtím než se čip umístil do senzoru, musel být vyjmut z roztoku thiolů, opláchnut ethanolem, Q-vodou a osušen dusíkem. V průběhu aktivace roztokem NHS (5,76 mg/ml) a EDC (38,3 mg/ml) se čip omýval Q-vodou, inkuboval 10 min v roztocích NHS a EDC a opět omýván Q-vodou. Po této aktivaci karboxylových skupin došlo k imobilizaci streptavidinu 50 ug/ml při 25°C a průtoku hadiček 20 ul/min v SA 10 pufru. K následnému odmývání nekovalentně imobilizovanému streptavidinu byl použit pufr PBS**, vzhledem k jeho velké iontové síle. Následně byl k čipu opět přiváděn SA10 pufr. K čipu, jehož povrch byl pokryt vrstvou imobilizovaného streptavidinu, byl hadičkami přiváděn roztok obsahující biotinované oligonukleotidy, které se navázaly na streptavidin (Obr.9). Tímto způsobem byla na povrchu senzoru vytvořena vrstva oligonukleotidů.

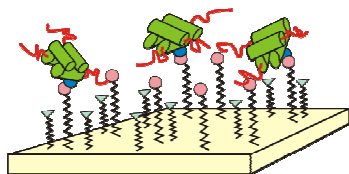
K čipu byl opět přiváděn pufr a poté se na tyto navázané biotinované oligonukleotidy zachytily komplementární oligonukleotidy. Došlo k tzv. hybridizaci a následně se detekovalo množství k sobě komplementárně navázaných oligonukleotidů. Jejich množství se určilo na základě odezvy, která byla vyhodnocena pomocí programu SETUP UP.



1. Vytvoření homogenní vrstvy alkanthiolů (SAM vrstva)



2. Aktivace karboxylových skupin NHS/EDC a immobilizace streptavidinu (50 ug/ml) na povrch pomocí peptidové vazby při 25°C SA 10 pufru .

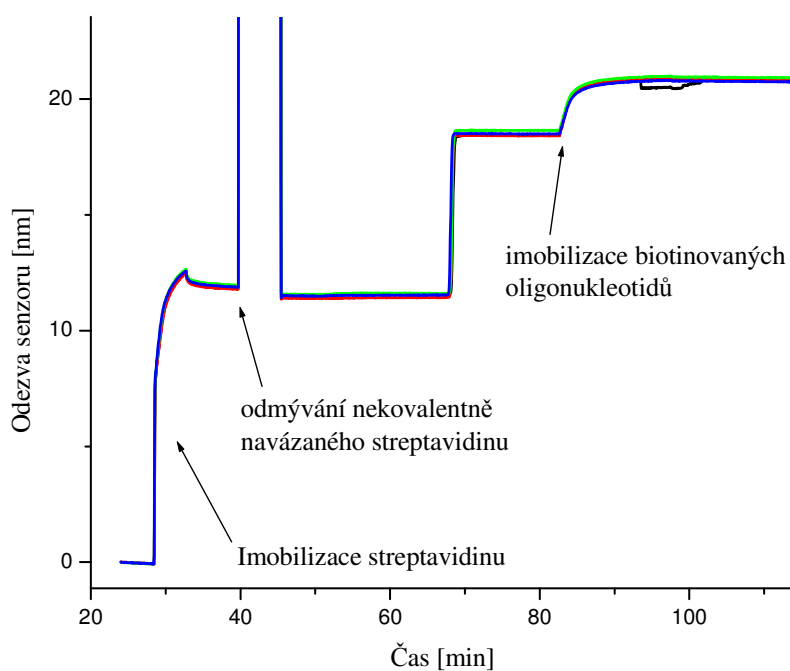


3. Immobilizace biotinovaných oligonukleotidů pomocí streptavidinu

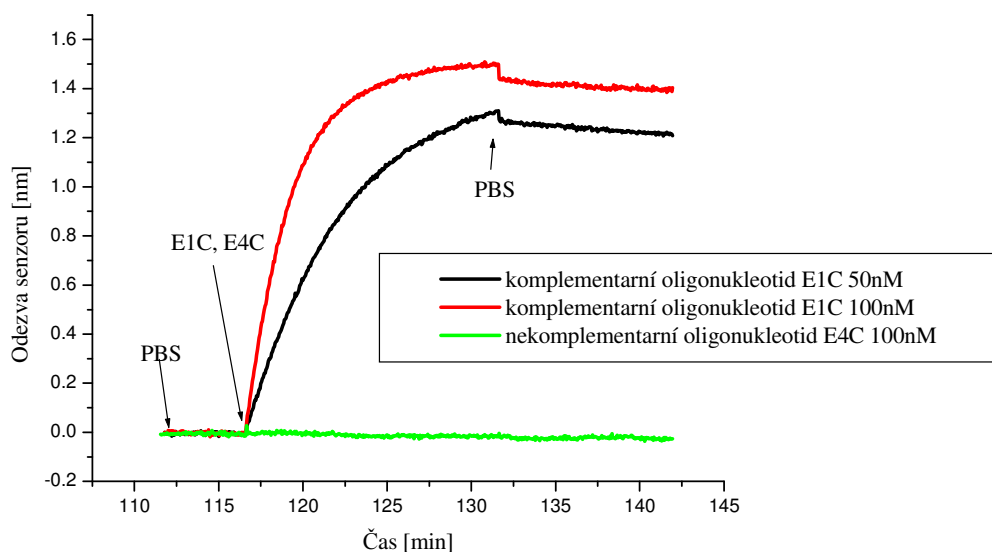
Obr.9.: Immobilizace oligonukleotidů

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

Na obr.10 je zaznamenána odezva senzoru v průběhu experimentu. Konečným krokem a tím nejdůležitějším v celé experimentální části byla imobilizace biotinovaných oligonukleotidů a následná hybridizace komplementárních oligonukleotidů.



Obr.10: Průběh měření

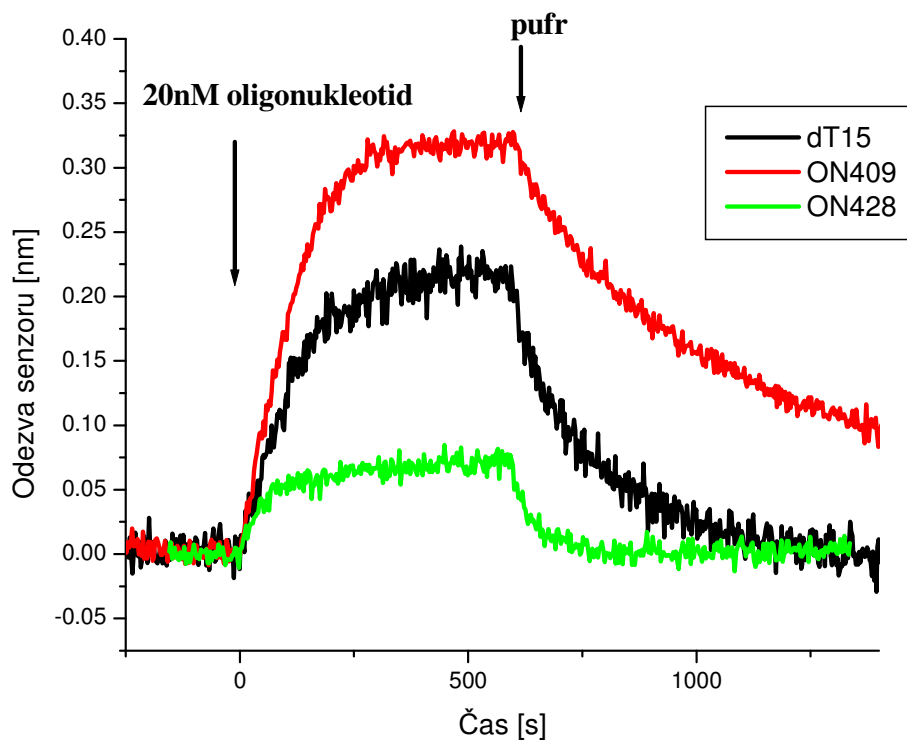


Obr.11: Hybridizace komplementárních a nekomplementárních oligonukleotidů

Samotnou hybridizaci popisuje Obr.11. K povrchu čipu byl přiveden PBS pufr, který obsahoval komplementární oligonukleotidy. Na již imobilizované biotinované oligonukleotidy E1 se navázaly komplementární oligonukleotidy E1C, což vedlo ke změně indexu lomu. Cíleně zde byla použita dvojí koncentrace těchto komplementárních oligonukleotidů a to 50 nM a 100 nM E1C. Odezvy senzoru byly při 50 nM 1.3 nm a při 100 nM 1.5 nm.

V obou případech zde došlo k úspěšné hybridizaci, avšak každá koncentrace zde vykazuje jinou rychlost reakce a rozdílné množství imobilizovaných komplementárních oligonukleotidů E1C. Jak je z grafu zřejmé, k rychlejší imobilizaci došlo u vzorku s vyšší koncentrací. Pro ověření hybridizace byl použit vzorek nekomplementárních oligonukleotidů E4C o koncentraci 100 nM. Z Obr.11 je zřejmé, že zde senzor nezaznamenal žádnou odezvu, z čehož se dá usoudit, že k typické hybridizaci nedošlo. Oba druhy oligonukleotidů E1C a E4C byly vzájemně nekomplementární.

Na obr. 12 je znázorněna ideální hybridizace k sobě komplementárních oligonukleotidů a zároveň potvrzení negativní odezvy biosenzoru při pokusu dosáhnout hybridizace u oligonukleotidů k sobě vzájemně nekomplementárních. Komplementarita bazí je natolik specifická, že zabrání navázání oligonukleotidů s jinou sekvencí báze.



Obr.12.: Hybridizace referenčního oligonukleotidu a modifikovaných oligonukleotidů

Obr.12 ukazuje, jaký mají vliv modifikace na stabilitu hybridního duplexu RNA/DNA. Na modelovém systému, se nechaly hybridizovat modifikované ON409 a ON428 se sekvencí poly rA15 o délce 15 bází. Jako referenční oligonukleotid byla zvolena přirozená nemodifikovaná sekvence dT15. Stabilita vzniklých duplexů se stanovila porovnáním odezvy SPR senzoru na hybridizaci modifikovaného a referenčního oligonukleotidu.

U modifikovaných oligonukleotidů jsou chemicky pozměněné tři báze rozmístěné rovnoměrně po celé délce oligonukleotidu. Vždy je modifikovaná cukr-fosfátová spojka mezi první a druhou bází, sedmou a osmou bází a třináctou a čtrnáctou bází.

Na Obr. 13 je znázorněn průběh hybridizace jak modifikovaných oligonukleotidů ON409 a ON428 tak i referenčního oligonukleotidu dT15. Odezva SPR biosenzoru na začátku rychle rostla u všech oligonukleotidů. Po několika minutách se odezva

stabilizovala na konstantní úrovni, která značí rovnovážný stav. Po deseti minutách hybridizace odezva sensoru dosáhla 0.2 nm pro dT15, 0.32 nm pro ON409 a 0.07 nm pro ON428. Po přivedení pufru k povrchu došlo k odmytí oligonukleotidů z povrchu čipu. Z grafu je vidět, že se nejrychleji štěpí ON428 a nejpomaleji u ON409. Tyto výsledky jasně ukazují, že modifikace u ON409 zvyšuje stabilitu hybridního duplexu v porovnání s přirozenou sekvencí dT15. Na druhou stranu modifikace u ON428 má destabilizující efekt na hybridní duplex. Z tohoto experimentu vyplývá, že modifikace u ON409 vzhledem k zvýšené stabilitě se jeví jako vhodnější pro další výzkum antisensních oligonukleotidů. V rámci dalších experimentů na tomto druhu oligonukleotidů by se testovala kritéria, která antisensní oligonukleotid, jež by byl aplikován jako potenciální antisensní léčivo, musí splňovat.

7. ZÁVĚR

Bakalářská práce byla vypracována na téma Studium molekulárních interakcí pomocí optických biosenzorů a jejich použití pro vývoj nových léčiv. V rešeršní části této práce byly obecně popsány jednotlivé typy biosenzorů, jejich historie, instrumentace a možné aplikace. Zaměřili jsme se na optický biosenzor, jež využívá metody rezonance povrchových plasmonů (SPR). Další část rešerše pojednává o antisensních oligonukleotidech. Bylo zde vysvětleno, co antisensní oligonukleotidy představují, jaké typy existují, na jakém principu fungují. Dále zde bylo popsáno, jak se dají využít v souvislosti s optickým biosenzorem s povrchovými plasmony, pomocí kterého se detekovala odezva jejich hybridizace.

Na základě této rešeršní části byl navržen modelový experiment spočívající v demonstraci využití SPR biosenzorů. Byly úspěšně vyzkoušeny hybridizace dvou typů antisensních oligonukleotidů a to nemodifikovaných a modifikovaných.

8. SEZNAM ZKRATEK

IUPAC – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)

EIS – elektrochemická impendanci spektroskopie

SPR – surface plasmon resonance, senzor s povrchovými plasmony

DNA - deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

HSV – herpes simplex virus

RSV – Rous Sarkom virus

AON – antisensní oligonukleotidy

ON - oligonukleotidy

CMV – cytomegalovirus

AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome , Syndrom získaného selhání imunity

FDA - Institut pro kontrolu potravin a léčiv

HBV – hepatitida B

HCV – hepatitida C

EBV – Epstein-Barrové virus

9. LITERATURA

1. Marshall, R.J., et al., *A Computer-System for Analysis of Chromatographic Data*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 1987. 1(3): p. 285-295.
2. Choi, S.H., J.W. Lee, and S.J. Sim, *Enhanced performance of a surface plasmon resonance immunosensor for detecting Ab-GAD antibody based on the modified self-assembled monolayers*. Biosensors & Bioelectronics, 2005. 21(2): p. 378-383.
3. Vaisocherova, H., et al., *Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein-Barr virus*. Biosensors & Bioelectronics, 2007. 22(6): p. 1020-1026.
4. Paddle, B.M., *Biosensors for chemical and biological agents of defence interest*. Biosensors & Bioelectronics, 1996. 11(11): p. 1079-1113.
5. Verma, N. and M. Singh, *A disposable microbial based biosensor for quality control in milk*. Biosensors & Bioelectronics, 2003. 18(10): p. 1219-1224.
6. Bakker, J., et al., *Reference values for N-terminal Pro-B-Type natriuretic peptide in umbilical cord blood*. Clinical Chemistry, 2004. 50(12): p. 2465-2465.
7. Ghindilis, A.L., et al., *Immunosensors: Electrochemical sensing and other engineering approaches*. Biosensors & Bioelectronics, 1998. 13(1): p. 113-131.
8. Wang, J., *Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999. 19(1-2): p. 47-53.
9. Bott, A.W., *Elektrochemical techniques for the characterization of redox polymers*. *Curr.Separat.*, 19, 71-75 (2001). 2001.
10. Katz, E.a.W., *Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors and enzyme biosensors*. *Electroanalysis*. 2003: p. 913-947.
11. Skladal, P., *Piezoelectric Biosensors*. Chemické Listy, 1995. 89(3): p. 170-179.
12. Polášková, M. *Nové materiály pro lékařství*. 2007 [cited; Available from: <http://www.inovace.cz/for-high-tech/medicina-a-farmacie/clanek/nove-materialy-pro-lekarstvi/>].
13. Danielsson, B., *The Enzyme Thermistor - a Versatile Instrument for Measurements on Enzymes, Substrates, and Cells*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1987. 501: p. 543-544.
14. Ramsden, J.J., *Optical biosensors*. Journal of Molecular Recognition, 1997. 10(3): p. 109-120.
15. Gauglitz, G., et al., *Chemical and Biochemical Sensors Based on Interferometry at Thin (Multi-)Layers*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1993. 11(1-3): p. 21-27.
16. Taitt, C.R., et al., *Nine-analyte detection using an array-based biosensor*. Analytical Chemistry, 2002. 74(23): p. 6114-6120.
17. Homola, J., *Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species*. Chemical Reviews, 2008. 108(2): p. 462-493.
18. Homola, J., *Present and future of surface plasmon resonance biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. 377(3): p. 528-539.

19. Tomizaki, K.Y., K. Usui, and H. Mihara, *Protein-detecting microarrays: Current accomplishments and requirements*. *Chembiochem*, 2005. 6(5): p. 783-799.
20. Forzani, E.S., et al., *Detection of heavy metal ions in drinking water using a high-resolution differential surface plasmon resonance sensor*. *Environmental Science & Technology*, 2005. 39(5): p. 1257-1262.
21. Wang, Z.Z., et al., *Surface plasmon resonance imaging for affinity analysis of aptamer - protein interactions with PDMS microfluidic chips*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. 389(3): p. 819-825.
22. Smith, R.K., P.A. Lewis, and P.S. Weiss, *Patterning self-assembled monolayers*. *Progress in Surface Science*, 2004. 75(1-2): p. 1-68.
23. Jung, L.S., et al., *Binding and dissociation kinetics of wild-type and mutant streptavidins on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers*. *Langmuir*, 2000. 16(24): p. 9421-9432.
24. Shankaran, D.R., K.V.A. Gobi, and N. Miura, *Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2007. 121(1): p. 158-177.
25. Baeumner, A.J., *Biosensors for environmental pollutants and food contaminants*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003. 377(3): p. 434-445.
26. Paterson, B.M., B.E. Roberts, and E.L. Kuff, *Structural Gene Identification and Mapping by DNA-Messenger-Rna Hybrid-Arrested Cell-Free Translation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. 74(10): p. 4370-4374.
27. Zamecnik, P.C. and M.L. Stephenson, *Inhibition of Rous-Sarcoma Virus-Replication and Cell Transformation by a Specific Oligodeoxynucleotide*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1978. 75(1): p. 280-284.
28. Melendez, M.M.a.A.J., *Advances in Antisense Oligonucleotide Development for Target Identification, Validation, and as Novel Therapeutics*. 2008: p. 275–295.
29. D. Němeček, E.K., P. Praus, J. Štěpánek, *Studium oligonukleotidů pokročilými technikami optické spektroskopie*. 2006.
30. Crooke, S.T., *Molecular mechanisms of action of antisense drugs*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes and Expression*, 1999. 1489(1): p. 31-44.
31. Dias, N., et al., *Antisense PNA tridecamers targeted to the coding region of Ha-ras mRNA arrest polypeptide chain elongation*. *Journal of Molecular Biology*, 1999. 294(2): p. 403-416.
32. Cohen, J., *Making sense of antisense*. *Scientist*, 2005. 19(5): p. 8-8.
33. Kurreck, J., *Antisense technologies - Improvement through novel chemical modifications*. *European Journal of Biochemistry*, 2003. 270(8): p. 1628-1644.
34. Sproat, B.S., et al., *Highly Efficient Chemical Synthesis of 2'-O-Methyloligoribonucleotides and Tetrabiotinylated Derivatives - Novel Probes That Are Resistant to Degradation by Rna or DNA Specific Nucleases*. *Nucleic Acids Research*, 1989. 17(9): p. 3373-3386.
35. Monia, B.P., et al., *Evaluation of 2'-Modified Oligonucleotides Containing 2'-Deoxy Gaps as Antisense Inhibitors of Gene-Expression*. *Journal of Biological Chemistry*, 1993. 268(19): p. 14514-14522.

36. Agrawal, S., et al., *Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: In vitro and in vivo studies*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. 94(6): p. 2620-2625.
37. Fluiter, K., et al., *In vivo tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides*. Nucleic Acids Research, 2003. 31(3): p. 953-962.
38. AC, S., *Technology evaluation: AVI-4126, AVI BioPharma*. 2004: p. 551-558.
39. Pytlík, R., *Terapie komplementárními oligonukleotidy*. Vesmír 75, 1996: p. 494.
40. Homola, J., *Optické biosenzory s povrchovými plasmony - Nástroj pro bioanalytiku*. Vesmír, 2009: p. 483-484.