



Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-17-0300**

Glykánové bionosenzory and bioanalytické zariadenia – ich konštrukcia, validácia a aplikácia v diagnostike rakoviny

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Ján Tkáč, DrSc.**

Príjemca **Chemický ústav SAV, v. v. i.**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Chemický ústav SAV, vvi; Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava
Ústav polymérov SAV, vvi; Dúbravská cesta 9, 845 41 Bratislava

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Qatar Univ, Ctr Adv Mat, Doha 2713, Qatar
2. Masaryk Univ, Fac Sci, Dept Phys Elect, Kotlarska 267-2, Brno 61137, Czech Republic
3. Czech Acad Sci, Inst Plasma Phys, Dept Pulse Plasma Syst, Vvi, Slovankou 3, Prague 18200, Czech Republic
4. Univ Copenhagen, Dept Chem, DK-1871 Copenhagen, Denmark
5. Lund Univ, Dept Clin Sci, Div Oncol & Pathol, SE-22185 Lund, Sweden
6. Univ Zurich, Dept Physiol, Zurich, Switzerland
7. Ctr Comprehens Canc, Zurich, Switzerland
8. Clin Ctr Serbia, Dept Nephrol, Belgrade 11000, Serbia
9. Univ Belgrade, Inst Applicat Nucl Energy INEP, Dept Metab, Belgrade 11080, Serbia
10. Univ Belgrade, Sch Med, Belgrade 11000, Serbia

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Bez udeleného patentu.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

- [1] M. Pavlickova, L. Lorencova, M. Hatala, M. Kovac, J. Tkac, P. Gemeiner, Facile fabrication of screen-printed MoS₂ electrodes for electrochemical sensing of dopamine, Scientific Reports, 12 (2022).
- [2] M. Hires, E. Jane, K. Kalavska, M. Chovanec, M. Mego, P. Kasak, T. Bertok, J. Tkac, Glycan signatures for the identification of cisplatin-resistant testicular cancer cell lines: Specific glycoprofiling of human chorionic gonadotropin (hCG), Cancer Medicine, 11 (2022) 968-982.
- [3] A. Bertokova, N. Svecova, K. Kozics, A. Gabelova, A. Vikartovska, E. Jane, M. Hires, T. Bertok, J. Tkac, Exosomes from prostate cancer cell lines: Isolation optimisation and characterisation, Biomedicine & Pharmacotherapy, 151 (2022).
- [4] J. Ziburova, M. Nemcovic, S. Sestak, J. Bellova, Z. Pakanova, B. Sivakova, A. Salingova, C. Sebova, M. Ostrozlikova, D.E. Lekka, J. Brucknerova, I. Brucknerova, M. Skoknova, A.

- Mc Cullough, G. Hrcckova, A. Hlavata, V. Bzduch, J. Mucha, P. Barath, A novel homozygous mutation in the human ALG12 gene results in an aberrant profile of oligomannose N-glycans in patient's serum, *American Journal of Medical Genetics Part A*, 185 (2021) 3494-3501.
- [5] J. Kollar, A. Popelka, J. Tkac, M. Zabka, J. Mosnacek, P. Kasak, Sulfobetaine-based polydisulfides with tunable upper critical solution temperature (UCST) in water alcohols mixture, depolymerization kinetics and surface wettability, *Journal of Colloid and Interface Science*, 588 (2021) 196-208.
- [6] M. Hatala, P. Gemeiner, L. Lorencova, M. Mikula, M. Hvojník, M. Pavlickova, A. Haz, D. Kosnac, T. Bertok, J. Tkac, Screen-printed conductive carbon layers for dye-sensitized solar cells and electrochemical detection of dopamine, *Chemical Papers*, 75 (2021) 3817-3829.
- [7] V.P. Gajdosova, L. Lorencova, A. Blsakova, P. Kasak, T. Bertok, J. Tkac, Challenges for impedimetric affinity sensors targeting protein detection, *Current Opinion in Electrochemistry*, 28 (2021).
- [8] A. Bertokova, T. Bertok, E. Jane, M. Hires, P. Dubjakova, O. Novotna, V. Belan, J. Fillo, J. Tkac, Detection of N,N-diacetyllactosamine (LacdiNAc) containing free prostate-specific antigen for early stage prostate cancer diagnostics and for identification of castration-resistant prostate cancer patients, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 39 (2021).
- [9] T. Bertok, V.P. Gajdosova, A. Bertokova, N. Svecova, P. Kasak, J. Tkac, Breast cancer glycan biomarkers: their link to tumour cell metabolism and their perspectives in clinical practice, *Expert Review of Proteomics*, 18 (2021) 881-910.
- [10] L. Lorencova, V. Gajdosova, S. Hroncekova, T. Bertok, M. Jerigova, D. Velic, P. Sobolciak, I. Krupa, P. Kasak, J. Tkac, Electrochemical Investigation of Interfacial Properties of Ti(3)C(2)T(x)MXene Modified by Aryldiazonium Betaine Derivatives, *Frontiers in Chemistry*, 8 (2020).
- [11] F. Kveton, A. Blsakova, P. Kasak, J. Tkac, Glycan Nanobiosensors, *Nanomaterials*, 10 (2020).
- [12] S. Hroncekova, T. Bertok, M. Hires, E. Jane, L. Lorencova, A. Vikartovska, A. Tanvir, P. Kasak, J. Tkac, Ultrasensitive Ti(3)C(2)T(X)MXene/Chitosan Nanocomposite-Based Amperometric Biosensor for Detection of Potential Prostate Cancer Marker in Urine Samples, *Processes*, 8 (2020).
- [13] T. Homola, L. Lorencova, L. Parrakova, P. Gemeiner, J. Tkac, Graphene oxide sensors of high sensitivity fabricated using cold atmospheric-pressure hydrogen plasma for use in the detection of small organic molecules, *Journal of Applied Physics*, 128 (2020).
- [14] V. Gajdosova, L. Lorencova, M. Prochazka, M. Omastova, M. Micusik, S. Prochazkova, F. Kveton, M. Jerigova, D. Velic, P. Kasak, J. Tkac, Remarkable differences in the voltammetric response towards hydrogen peroxide, oxygen and Ru(NH₃)₆(³⁺) of electrode interfaces modified with HF or LiF-HCl etched Ti₃C₂T_x MXene, *Microchimica Acta*, 187 (2020).
- [15] V. Gajdosova, L. Lorencova, P. Kasak, J. Tkac, Electrochemical Nanobiosensors for Detection of Breast Cancer Biomarkers, *Sensors*, 20 (2020).
- [16] T. Bertok, E. Jane, N. Chrenkova, S. Hroncekova, A. Bertokova, M. Hires, A. Vikartovska, P. Kubanikova, R. Sokol, J. Fillo, P. Kasak, L. Borsig, J. Tkac, Analysis of serum glycome by lectin microarrays for prostate cancer patients—a search for aberrant glycoforms, *Glycoconjugate Journal*, 37 (2020) 703-711.
- [17] M. Baralic, N. Gligorijevic, V. Brkovic, J. Katrik, L. Pazitna, M. Sunderic, G. Miljus, A. Penezic, Z. Dobrijevic, M. Lausevic, O. Nedic, D. Robajac, Fibrinogen Fucosylation as a Prognostic Marker of End-Stage Renal Disease in Patients on Peritoneal Dialysis, *Biomolecules*, 10 (2020).
- [18] J. Tkac, V. Gajdosova, S. Hroncekova, T. Bertok, M. Hires, E. Jane, L. Lorencova, P. Kasak, Prostate-specific antigen glycoprofiling as diagnostic and prognostic biomarker of prostate cancer, *Interface Focus*, 9 (2019).
- [19] J. Tkac, T. Bertok, M. Hires, E. Jane, L. Lorencova, P. Kasak, Glycomics of prostate cancer: updates, *Expert Review of Proteomics*, 16 (2019) 65-76.
- [20] F. Kveton, A. Blsakova, L. Lorencova, M. Jerigova, D. Velic, O. Blixt, B. Jansson, P. Kasak, J. Tkac, A Graphene-Based Glycan Biosensor for Electrochemical Label-Free Detection of a Tumor-Associated Antibody, *Sensors*, 19 (2019).
- [21] M. Hires, E. Jane, M. Mego, M. Chovanec, P. Kasak, J. Tkac, Glycan Analysis as Biomarkers for Testicular Cancer, *Diagnostics*, 9 (2019).
- [22] A. Blsakova, F. Kveton, P. Kasak, J. Tkac, Antibodies against aberrant glycans as

cancer biomarkers, Expert Review of Molecular Diagnostics, 19 (2019) 1057-1068.

[23] T. Bertok, L. Lorencova, E. Chocholova, E. Jane, A. Vikartovska, P. Kasak, J. Tkac, Electrochemical Impedance Spectroscopy Based Biosensors: Mechanistic Principles, Analytical Examples and Challenges towards Commercialization for Assays of Protein Cancer Biomarkers, Chemelectrochem, 6 (2019) 989-1003.

[24] E. Chocholova, T. Bertok, L. Lorencova, A. Holazova, P. Farkas, A. Vikartovska, V. Bella, D. Velicova, P. Kasak, A.A. Eckstein, J. Mosnacek, D. Hasko, J. Tkac, Advanced antifouling zwitterionic layer based impedimetric HER2 biosensing in human serum: Glycoprofiling as a novel approach for breast cancer diagnostics, Sensors and Actuators B-Chemical, 272 (2018) 626-633.

Uplatnenie výsledkov projektu

Protilátky (Abs) sú ochranné glykoproteíny s vysokou afinitou a špecificita k antigénom, ktoré sú cudzorodými prvkami v tele, čo vedie ku konečnej eliminácii antigénu. Veľmi úzkou, ale zároveň dôležitou triedou sú Abs proti aberantným glykánom. Za normálneho stavu imunitný systém rozpoznáva cudzorodé látky, ignoruje bunky a štruktúry vlastného tela. Imunitný systém produkuje Abs, keď zistí, že cudzorodé látky prenikli do tela. Na druhej strane, anti-glykánové protilátky (AGA) sú produkované ľudským telom a namierené proti vlastným telesným štruktúram/biomolekulám prítomných v tkanivách a orgánoch, keď imunitný systém nesprávne rozpoznáva „vlastné“ štruktúry ako cudzorodé. Výsledkom aberantnej glykozylácie je expresia neobvyklých/neprirodzených glykánových štruktúr vo vnútri bunky. Imunitný systém nemá žiadnu toleranciu voči týmto štruktúram a začne produkovať Abs. Takéto AGA napádajú vlastné bunky, tkanivá a/alebo orgány, čím spôsobujú zápal a vážne poškodenia organizmu. Na druhej strane sekrécia aberantných glykoforiem do krvného obehu aktivuje expresiu AGA, ktoré môžu byť aplikované na diagnostiku chorôb v ranom štádiu, dokonca aj v prípade, že ešte nie sú prítomné žiadne iné významné klinické ukazovatele. Tieto špecifické AGA sú detekovateľné už dávno predtým ako glykoproteíny spojené s nádorom dosahujú detegovateľnú hustotu/koncentráciu a teda by sa mohli použiť ako biomarkery pre rôzne typy chorôb, vrátane rakoviny pre následné úspešné liečenie chorôb. Úroveň AGA môže korelovať s prognózu ochorenia, mierou prežitia ale môže byť použitá aj na monitorovanie progresu ochorenia. Výsledky riešenia projektu sú aplikovateľné pri stanovení AGA (Anti-Glycan Antibodies) v ľudských krvných sérach vo formáte modifikovanej ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays) s vysokou citlivosťou stanovenia a nízkym LOD.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Počas riešenia projektu sme úspešne využívali rôzne nanomateriály ako GO, 2D nanomateriály MXénu a MoS₂, hybridných magnetických častíc a magnetických častíc terminovaných s -COOH skupinami ako nanomateriálov. Glykány boli na povrch viazané aj s využitím proteínov ako nanolešenia – ľudský sérový albumín, alebo hovädzí sérový albumín. Rôzne povrchy a ich modifikácie sme detailne charakterizovali širokou paletou techník akými sú AFM, XPS, FTIR, SEM, SIMS, Ramanovou spektroskopiou, SPR, QCM, EIS, ampérometriou a meraním kontaktného uhla.

V práci sme využili hybridné magnetické častice s vonkajšou zlatou škrupinou na štandardnú chemisorpciu tiolov na vytvorenie Au-S väzby. Týmto spôsobom je možné kontrolovať hustotu funkčných skupín na povrchu takýchto častíc a teda je možné následne kontrolovať aj hustotu ligandov na povrchu. Navyše zwitteriónové deriváty zakončené diazóniovou skupinou je možné elektrochemicky graftovať na elektródy, čo môže byť využité pri cielenej imobilizácii na preddefinované elektródy v rámci elektródového array formátu. Zároveň je nutné podotknúť, že diazóniové skupiny zwitteriónov je možné graftovať na hybridné magnetické častice bez nutnosti redox aktivácie, keďže tenká zlatá vrstva na povrchu týchto častíc vykazuje voľné plazmóny, využiteľné na ich spontánne graftovanie. V práci sme zistili, že graftovanie zwitteriónov s diazóniovými skupinami je možné s využitím voľných plazmónov, avšak takéto graftovanie je menej účinné v porovnaní s elektrochemickým graftovaním a bolo teda použité najmä na modifikáciu elektród s využitím redox graftovania. Okrem toho sme použili aj klasické magnetické častice s imobilizovaným biokonjugátom glykán-BSA na detekciu AGA ako analytu. Tento formát analýzy je preferovaný, keďže je veľmi jednoduchý s možnosťou analyzovať relatívne vysoké počty

vzoriek.

Meranie s využitím elektrochemických metód však nebolo jednoduché integrovať do array formátu. Klasická fluorescenčná microarray neposkytovala požadovanú citlivosť merania s nízkymi LOD, preto sme sa v práci sústredili na možnosti integrácie meracieho formátu na formát ELISA s využitím magnetických (nano)častíc na efektívnu separáciu analytu a následné zvýšenie citlivosti merania. Nižšie LOD (0,45 pM) bolo možné dosiahnuť s využitím polyHRP na amplifikáciu generovania optického signálu. V práci sme sa sústredili na možnosti využitia merania v ELISA formáte, ktorý nám umožňuje analýzu veľkého množstva vzoriek na jednej ELISA platničke vo formáte, ktorý je vysoko reprodukovateľný. Výsledky ukazujú, že ELISA formát analýzy poskytuje vysokú spoľahlivosť pri použití vzoriek séra, čo dokazuje recovery index 98 % – 104 % pre stanovenie AGA. Ďalšou výhodou metódy testu je, že platforma založená na magnetických guľôčkach je kompatibilná s mikrofluidnými platformami, čo vedie k vývoju diagnostických zariadení na mieste starostlivosti so zvýšenou selektivitou, citlivosťou a rýchlosťou analýzy.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

During the project implementation, we successfully used various nanomaterials such as GO, 2D nanomaterials of MXene and MoS₂, hybrid magnetic particles and magnetic particles terminated with -COOH groups as nanomaterials. Glycans were also bound to the surface using proteins as nanoscaffolds - human serum albumin or bovine serum albumin. We characterized various surfaces and their modifications in detail using a wide range of techniques such as AFM, XPS, FTIR, SEM, SIMS, Raman spectroscopy, SPR, QCM, EIS, amperometry and contact angle measurement.

In this work, we used hybrid magnetic particles with an outer gold shell for the standard chemisorption of thiols to create an Au-S bond. In this way, it is possible to control the density of functional groups on the surface of such particles, and thus it is possible to subsequently control the density of ligands on the surface. In addition, zwitterionic derivatives terminated with a diazonium group can be electrochemically grafted onto electrodes, which can be used for targeted immobilization on predefined electrodes within the electrode array format. At the same time, it is necessary to point out that diazonium groups of zwitterions can be grafted onto hybrid magnetic particles without the need for redox activation, since the thin gold layer on the surface of these particles exhibits free plasmons, which can be used for their spontaneous grafting. In our work, we found that zwitterion grafting with diazonium groups is possible using free plasmons, but such grafting is less effective compared to electrochemical grafting and was therefore mainly used to modify electrodes using redox grafting. In addition, we also used classical magnetic particles with an immobilized glycan-BSA bioconjugate to detect AGA as an analyte. This analysis format is preferred as it is very simple with the ability to analyze relatively high numbers of samples.

However, the measurement using electrochemical methods was not easy to integrate into the array format. The classic fluorescent microarray did not provide the required measurement sensitivity with low LOD, so in this work we focused on the possibilities of integrating the measurement format into the ELISA format using magnetic (nano)particles for efficient separation of the analyte and subsequent increase in measurement sensitivity. A lower LOD (0.45 pM) could be achieved using polyHRP to amplify optical signal generation. In our work, we focused on the possibility of using the measurement in the ELISA format, which allows us to analyze a large number of samples on one ELISA plate in a format that is highly reproducible. The results show that the ELISA format of the analysis provides high reliability when using serum samples, as evidenced by a recovery index of 98% - 104% for the determination of AGA. Another advantage of the assay method is that the magnetic bead-based platform is compatible with microfluidic platforms, leading to the development of point-of-care diagnostic devices with increased selectivity, sensitivity and speed of analysis.