

**Univerzitet u Beogradu**  
**Hemijski fakultet**



**Luka V. Dragačević**

**Profilisanje površinskog glikolizovanja  
mikroorganizama biljnim lektinima**

**- doktorska disertacija -**

**Beograd, 2022**

**University of Belgrade**  
**Faculty of Chemistry**



**Luka V. Dragačević**

**Profiling surface glycosylation of  
microorganisms using plant lectins**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2022**

**Mentori:**

**Dr Natalija Polović**

redovni profesor Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

**Dr Rajna Minić**

naučni savetnik Instituta za virusologiju, vakcine i serume - Torlak

**Članovi komisije:**

---

**Dr Marija Gavrović-Jankulović**

redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

---

**Dr Vesna Ilić**

naučni savetnik Instituta za medicinska istraživanja, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu

---

**Dr Milica Popović**

vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

---

Datum odbrane

## **Zahvalnica**

*Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije je urađen u Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak”, u Odseku za naučno-istraživački rad.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem mentorki dr Rajni Minić, koja je do samog kraja ispratila ovu doktorsku disertaciju. Hvala na velikodušnom deljenju znanja i iskustva, velikoj pomoći u planiranju eksperimenata, obradi i tumačenju rezultata, ali i podršci i entuzijazmu prilikom izrade ove disertacije.*

*Mentoru, profesorki dr Nataliji Polović sa Hemijskog fakulteta dugujem posebnu zahvalnost zbog podrške koju je pokazala tokom mojih doktorskih studija.*

*Veliku zahvalnost dugujem profesorki dr Mariji Gavrović-Jankulović na nesebičnoj pomoći prilikom izrade eksperimenata i kritičkoj analizi koji su prethodili izradi ove disertacije.*

*Zahvaljujem se naučnoj savetnici dr Vesni Ilić na korisnim predlozima i sugestijama prilikom pisanja disertacije.*

*Zahvaljujem se vanrednom profesoru dr Milici Popović na korisnim sugestijama prilikom izrade disertacije.*

*Posebno se zahvaljujem mojim kolegama iz Odseka za naučno-istraživački rad, Instituta za virusologiju, vakcine i serume “Torlak” u Beogradu na podršci, pomoći i lepom druženju, tokom izrade ove disertacije.*

*Na kraju posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, koji su uvek verovali u mene, i dragim prijateljima na neprocenjivoj podršci i razumevanju.*

*Luka Dragačević*

# Profilisanje površinskog glikolizovanja mikroorganizama biljnim lektinima

## SAŽETAK

Interakcije između mikroorganizama i domaćina imaju glavnu ulogu u infekciji i progresiji infektivnih bolesti. Upravo zbog toga postoji opravdana potreba da se identifikuju i okarakterišu sve komponente koje učestvuju u toj interakciji. Procesom glikozilacije na površini svih mikroorganizama formira se jedinstvena arhitektura površinskih polisaharidnih struktura i upravo ovaj proces smatra se ključnim faktorom virulencije mnogih mikroorganizama.

Površinske polisaharidne strukture mikroorganizama su značajne jer ostvaruju direktan kontakt sa "receptorskim" strukturama na ćelijama domaćina i varijabilnim regionima antitela, ali prvenstveno u formiranju mehanizama za izbegavanje imunskog odgovora. Upravo ove površinske strukture igraju važnu ulogu prilikom prepoznavanja od strane imunskog sistema domaćina, pa se tako vakcinacija protiv nekih patogenih mikroorganizama zasniva na vakcinaciji polisaharidnim komponentama kovalentno vezanim za proteinske nosače.

U ovoj studiji detekcija interakcija i profilisanje polisaharidnih struktura vršena je uporedo, Enzim vezujućim lektin sorbent esejom (engleski: Enzyme-linked lectin sorbent assay, ELLSA) i protočnom citometrijom. Za oba načina detekcije površinske glikozilacije korišćeno je 8 biljnih lektina, definisane specifičnosti: *Maackia amurensis* aglutinin - MAA, lektin soje (engleski: *Soybean* agglutinin) - SBA, lektin sočiva (engleski: *Lens culinaris* agglutinin) - LCA, lektin pšenične klice (engleski: Wheat germ agglutinin) - WGA, Ricinus lektin (engleski: *Ricinus communis* agglutinin) - RCA<sub>120</sub>, *Canavalia ensiformis* lektin - Con A, lektin Crne zove (engleski: *Sambucus nigra* agglutinin) - SNA I i rekombinantni banana lektin dobijen iz *Musa acuminata* – BanLec, s tim da su u ELLSA metodi korišćeni lektini obeleženi biotinom, a u protočnoj citometriji – fluoresceinom ili dodatkom zelenog fluorescentnog proteina.

Osim ispitivanja da li se različiti lektini vezuju za mikroorganizme potrebno je ispitati i jačinu vezivanja, što je vršeno pomoću određivanja konstante brzine disocijacije. Za tu svrhu korišćena je Tehnologija automatizovane mikrovage na kristalu kvarca (QCM, engleski: Quartz Crystal Microbalance). Na QCM senzor čip kuplovan je ConA za koji je vezana bakterija od interesa, te je praćena disocijacija različitih lektinskih molekula. Konkretno koristili smo *Lactobacillus helveticus* LAFTI i 4 biljna lektina: MAA, SBA, LCA i ConA.

Cilj ove doktorske disertacije je bio uspostavljanje brzog načina detekcije - *skrininga*, ELLSA, kojim je moguće simultano testirati interakciju većeg broja mikroorganizama sa određenim brojem biotinih lektina poznate specifičnosti, a analizom interakcija i profilisati arhitekturu polisaharidne strukture na površini mikroorganizama. Takođe ova metoda omogućava brzo određivanje specifičnosti novoizolovanih ili genetski modifikovanih lektina mikroorganizama.

U okviru ove doktorske disertacije pokazali smo rezultate komparativne analize, na preko 30 različitih mikroorganizama, ELLSA i protočne citometrije, koja se zasniva na interakcijama fluorescentno obeleženih lektina i polisaharidnih struktura. Obe metode, daju

identične rezultate kada je u pitanju prisustvo ili odsustvo interakcija, uz visoke vrednosti koeficijenta korelacije kada je u pitanju poređenje intenziteta signala.

Analizom karakteristika vezivanja površinski dostupnih polisaharidnih struktura korišćenjem većeg broja različitih biljnih lektina većim brojem lektina, pokazana je kompleksnost i raznovrsnost površinskog polisaharidnog omotača pojedinih mikroorganizama.. Sa druge strane, pokazana je i visoka selektivnost određenih lektina kao na primer, RCA<sub>120</sub> koji specifično vezuje samo *L. casei* DG, od korišćenih mikroorganizama.

Istraživanja realizovana u okviru izrade ove doktorske disertacije potvrdila su da BanLec ima mogućnost raspoznavanja  $\beta$ -glukanom bogatih površina mikroorganizama. Upravo ova unikatna specifičnost BanLec može biti iskorišćena za potrebe skrininga i potencijalnu detekciju  $\beta$ -glukana.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji doveli su do razvijanja i validacije ELLSA metode kao nove, brze, pouzdane i jeftine metode za pretragu novoizolovanih mikroorganizama za tražene selektivne osobine u smislu površinskog sastava polisaharida. Takođe, izvršena je i evaluacija protočne citometrije kao metode u profilisanju glikozilacije površinskih struktura mikroorganizama.

Validiranjem ELLSA metode pruža se mogućnost za analizu novih, prirodnih i rekombinantnih lektina nepoznate specifičnosti i definisanje njihove specifičnosti na osnovu poređenja sa lektinima poznate specifičnosti. A istovremeno, otvara se mogućnost korišćenja mikroorganizama kao samoodrživih glikanskih standarda.

**Ključne reči:** mikroorganizmi, glikozilacija, biljni lektini, *Salmonella*, *Lactobacillus*, kvasci, ELLSA

**Naučna oblast:** Biohemija

**Uža naučna oblast:** Imunologija

# Profiling surface glycosylation of microorganisms using plant lectins

## ABSTRACT

The interaction between microorganisms and their potential host plays a major role in infection and progression of infective diseases. To better understand those mechanisms, there is a need to identify and characterize all the components involved in that interaction.

Surface polysaccharide structures of microorganisms are unique in architecture, and they are often key virulence factors of many microorganisms, which shield them from the immune system and are involved in immune evasion mechanisms. In parallel, polysaccharide structures found on the surface of microorganisms act as “receptor” structures for host cells or act as epitopes of antibacterial antibodies. This holds true, for example, for vaccination against certain pathogenic microorganisms which is based on polysaccharide components that are covalently bound to protein carriers.

In this study, two methods were used in parallel, Enzyme-linked lectin sorbent assay (ELLSA) and flow cytometry, to explore lectin-saccharide interactions and to determine the profile of polysaccharide structures found on the surface of different microorganisms. Eight different plant lectins, of known specificities were used: *Maackia amurensis* agglutinin - MAA, Soybean agglutinin - SBA, *Lens culinaris* agglutinin - LCA, Wheat germ agglutinin - WGA, *Ricinus communis* agglutinin - RCA<sub>120</sub>, lectin isolated from *Canavalia ensiformis* - Con A, *Sambucus nigra* agglutinin - SNA I and the recombinantly produced banana lectin obtained from *Musa acuminata* – BanLec. When ELLSA method was performed, all lectins were biotinylated, while in flow cytometry two model lectins were used either fluorescein-labeled or with a fluorescent protein attached.

In addition to the previously mentioned analysis, the strength of interactions was also determined, in particular the dissociation rate constant. For this purpose QCM (engleski: Quartz Crystal Microbalance) technology was used. Bacteria was attached to a QCM sensor chip coated with ConA and the dissociation of lectins was monitored. As a microorganism of interest *Lactobacillus helveticus* LAFTI was chosen and four plant lectins: MAA, SBA, LCA, and ConA.

The goal of this thesis was to develop a fast and reliable method of surface saccharide detection, and such method would simultaneously allow interaction testing of multiple microorganisms with biotinylated lectins of known specificity. As a result, we would be able to profile the architecture of polysaccharide structures found on the surface of these microorganisms and be able to analyze those interactions. This method would also allow fast determination of specificity of newly isolated or genetically modified lectins or polysaccharide structures on microorganisms.

Interactions between fluorescently labeled lectins and surface polysaccharide structures, on over 30 different microorganisms, were studied with both ELLSA and flow cytometry which provided comparative results. Both methods, provided the same results

in respect to detecting the presence or absence of lectin-saccharide interactions and resulted in high correlation coefficient, when comparing signal intensity.

---

The analysis of binding characteristic of surface available polysaccharide structures using different plant lectins, showed the complexity of surface polysaccharide structures of certain microorganisms, that interacted with multiple lectins of different specificities. The data presented also showed high selectivity of certain lectins, such as RCA<sub>120</sub>, that shows high specificity to *L. casei DG*.

Experiments performed as part of this thesis confirmed that BanLec has the ability to recognise microorganisms with  $\beta$ -glucan rich surfaces. This unique specificity can be explored for the screening and potential detection of  $\beta$ -glucans.

Results provided in this thesis led to the development and validation of ELLSA method as new, fast, reliable, and cheap method for identifying selected surface polysaccharide composition of newly isolated microorganisms. In addition, evaluation of flow cytometry as a method in profiling surface glycan structures of microorganisms, was performed in parallel.

Validation of the ELLSA method, provides the possibility for the analysis of new natural and recombinantly produced lectins of unknown specificity, defining their specificity by comparing it with lectins of known specificities. At the same time, the possibility of using microorganisms as self-sustaining glycan probes is confirmed.

**Key words:** microorganisms, glycosylation, plant lectins, *Salmonella*, *Lactobacillus*, kvasci, ELLSA

**Scientific field:** Biochemistry

**Scientific subfield:** Immunology

---

## SKRAĆENICE

**AA** – monomerni rastvor akrilamida

**AER** – aerobni uslovi

**APS** - amonijum persulfate

**Asp** - asparagin

**BanLec** – Banana lektin

**BCIP** - 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat

**BFP** – Brom fenil plavo

**BHI** – Moždano-srčani bujon (engleski: Brain Heart Infusion)

**BSA** - goveđi serum albumin

**CBB G-250**– *Coomassie brilliant blue G-250*

**CBD** – Ugljenohidratni vezujući domen (engleski: Carbohydrate-Binding Domain)

**CBP** – Ugljenohidratni vezujući protein (engleski: Carbohydrate-Binding Protein)

**CFU** – engleski: Colony Forming Unit

**CI** – klinički izolat

**ConA** –*Canavalia ensiformis* lektin

**CPS** – kapsularni polisaharid

**CRD** - Ugljenohidratni prepoznajući domen (engleski: Carbohydrate-Recognition Domain)

**CV** – koeficijent varijacije

**DATDH** - 2,4-diacetoamido-2,4,6-trideoksiheksozu

**DIG** - digoksinin

**DMSO** – dimetilsulfoksid

**EEL** - *Euonymus europaeus* lektin

**EIS** – Spektroskopija Elektrohemijske Impedance (engleski: Electrochemical Impedance Spectroscopy)

**ELISA** – Enzim vezujući imunosorbent esej (engleski: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

**ELLSA** – Enzim vezujući lektin sorbent esej (engleski: Enzyme-Linked Lectin Sorbent Assay)

**EMA** – Evropska Medicinska Agencija (engleski: *European Medicines Agency*)

**FITC** – fluorescein 5(6)- izocijanat

**Fuc** - fukoza

**FucNAc** - N-acetil-fukozamin

**Gal** – galaktoza

**GalNAc** – N-acetil galaktozamin

**Glc** – glukoza

**GlcNAc** – N-acetil glukozamin

**HPLC** – tečna hromatografija visokih preformansi

**HRP** – engleski: *Horseradish peroxidase*

**IC50** – polovina maksimalne inhibitorne koncentracije

**IgA** – imunoglobulin A

**IgG** – imunoglobulin G

**Ka** – konstanta asocijacije

**LCA** - Sočivo lektin (engleski: *Lens culinaris agglutinin*)

**LOS** - lipooligosaharid

**LPS** - lipopolisaharid

**MAA** –*Maackia amurensis* aglutinin

**Man** – manoza

**MAL** - *Maackia amurensis* lektin

**MI** – mikroaerofilni uslovi

**MRS** – *De Man, Rogosa and Sharp* bujon

**MurNAc** - N-acetilmuraminska kiselina

**NB** – hranljivi bujon

**NBT** - *Nitro Blue Tetrazolim*

**Neu5Ac** – sialinska kiselina

**OST** – oligosaharid transferaza

*p* - verovatnoća

**PAGE** - poliakrilamid gel elektroforeza

**PBS** - fosfatom puferisan fiziološki rastvor

**Pcc** - *Pearson*-ov korelacioni koeficijent

**PCR** – *reakcija lančane polimerizacije* (engleski: *Polymerase Chain Reaction*)

**PE** - fikoeritrin

**PFA** – paraformaldehid

**PhHA-E** – *Phaseolus vulgaris erythroagglutinin*

**PhHA-L4** - *Phaseolus vulgaris L4*

**pNPP** – p-Nitrofenil Fosfat

**PSAg** - prostata specifični antigen

**PUZ** – pufer za pripremu uzoraka

**QCM** – Tehnologija automatizovane mikrovage na kristalu kvarca (engleski: Quartz Crystal Microbalance)

**RCA<sub>120</sub>** - Ricinus lektin (engleski: *Ricinus communis* agglutinin)

**Sacc** – mešavina monosaharida

**SBA** - Sojin lektin (engleski: *Soybean* agglutinin)

**SD** – standardna devijacija

**SDB** – *Sabouraud Dextrose Broth* bujon

**SDS** - natrijum dodecilsulfat (engleski: *sodium dodecyl sulphate*)

**Ser** - serin

**SNA I** - lektin Crne zove (engleski: *Sambucus nigra* agglutinin)

**SRP** - engleski: Surface Plasmon Resonance

**TEMED** - N, N, N', N'- tetrametiletildiamin

**Thr** – treonin

**Tyr** - tirozin

**UEA** – *Ulex europaeus* aglutinin

**WGA** - lektin Pšenične klice (engleski: Wheat germ agglutinin)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	2
<b>2. OPŠTI DEO</b>	4
<b>2.1 Struktura bakterijskog ćelijskog zida</b>	5
<b>2.2 Struktura fungalnog ćelijskog zida</b>	6
<b>2.3 Glikozilacija i glikanske strukture na površini mikroorganizama</b>	7
<b>2.4 Lektini</b>	10
2.4.1 Istorija istraživanja lektina	10
2.4.2 Definicija i uloga biljnih lektina	13
2.4.3 Struktura lektina	14
2.4.4 Opšta klasifikacija lektina	14
2.4.5 Klasifikacija biljnih lektina	15
2.4.6 Specifičnost lektina	17
2.4.7 Karakteristike lektina korišćenih u studiji	18
<b>2.5 Metode za detekciju patogena</b>	19
2.5.1 Analitičke metode na bazi lektina	21
2.5.2 Lektinski mikroeseji	23
2.5.3 Biosenzori na bazi lektina	24
2.5.4 ELLSA	25
2.5.5 QCM	26
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	28
<b>4. NAŠI RADOVI</b>	30
<b>4.1 Efikasnost biotininovanja i analiza čistoće lektina</b>	30
<b>4.2 Optimizacija ELLSA sa celim mikroorganizmima</b>	32
4.2.1 Određivanje optimalne koncentracije lektina u ELLSA	32
4.2.2 Analiza vezivanja lektina i mikroorganizama	33
4.2.3 Vizuelizacija vezivanja lektina	35
4.2.4 Titracija vezivanja lektina za mikroorganizme	36
4.2.5 Ispitivanje vezivanja BanLec-a za $\beta$ -D-glukan	37
4.2.6 Inhibicija vezivanja BanLec-a za $\beta$ -D-glukan	38
<b>4.3 Validacija ELLSA metode</b>	41

4.3.1	Specifičnost vezivanja lektina za mikroorganizme .....	42
4.3.2	Tačnost ELLSA i protočne citometrije .....	47
4.3.3	Linearnost ELLSA i protočne citometrije .....	49
4.3.4	Preciznost ELLSA i protočne citometrije .....	51
<b>4.4</b>	<b>Međusobno poređenje vezivanja korišćenih lektina za mikroorganizme .....</b>	<b>55</b>
<b>4.5</b>	<b>Ispitivanje interakcija lektina sa površinskim bakterijskim saharidima pomoću QCM tehnologije .....</b>	<b>56</b>
<b>4.6</b>	<b>Poređenje vezivanja serumskih imunoglobulina (IgG i IgA) sa vezivanjem lektina za mikroorganizme .....</b>	<b>58</b>
<b>4.7</b>	<b>Ispitivanje glikozilacije virusnih vakcina .....</b>	<b>64</b>
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI RAD .....</b>	<b>69</b>
<b>6.1</b>	<b>Određivanje koncentracije proteina .....</b>	<b>69</b>
6.1.1	Određivanje koncentracije proteina <i>Bradford</i> -ovom metodom .....	69
6.1.2	Određivanje koncentracije proteina <i>Lowry</i> -jevom metodom .....	70
<b>6.2</b>	<b>Analiza čistoće lektina obeleženih biotinom .....</b>	<b>72</b>
6.2.1	Natrijum dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE) ..	72
6.2.2	Bojenje gelova .....	74
<b>6.3</b>	<b>Korišćeni sojevi mikroorganizama, kvantifikacija i oblaganje mikrotitarskih ploča .....</b>	<b>75</b>
6.3.1	Određivanje broja živih mikroorganizama spektrofotometrijski .....	77
6.3.2	Procena odnosa živih prema mrtvim mikroorganizmima pomoću protočne citometrije .....	77
6.3.3	Određivanje ukupnog broja mikroorganizama brojanjem u hemocitometarskoj komori .....	77
6.3.4	Određivanje količine mikroorganizama spektrofotometrijski .....	78
<b>6.4</b>	<b>Oblaganje mikrotitar ploča mikroorganizmima .....</b>	<b>78</b>
<b>6.5</b>	<b>Korišćeni lektini, obeležavanje lektina biotinom i fluoresceinom .....</b>	<b>78</b>
6.5.1	Lektini korišćeni u ovoj studiji .....	78
6.5.2	Obeležavanje lektina biotinom .....	79
6.5.3	Dot blot .....	80
<b>6.6</b>	<b><i>In vitro</i> ispitivanje vezivanih karakteristika lektina primenom ELLSA .....</b>	<b>80</b>
6.6.1	Detekcija vezivanja biotinirovanih biljnih lektina za mikroorganizme .....	82

6.6.2	Serijska titracija biotiniziranih lektina	83
6.6.3	Inhibicija vezivanja lektina različitim monosaharidima	83
6.6.4	$\beta$ -glukan ELLSA	83
6.6.5	Određivanje nivoa serumskog IgG i IgG potklasa specifičnih prema odabranim mikroorganizmima	83
6.6.6	Određivanje nivoa serumskog IgA i IgA potklasa specifičnih prema odabranim mikroorganizmima	84
6.6.7	Određivanje afiniteta vezivanja biljnih lektina za različite tipove virusnih vakcina	84
<b>6.7</b>	<b>Protočna citometrija</b>	<b>86</b>
6.7.1	Obeležavanje lektina fluoresceinom	86
6.7.2	Analiza vezivanja lektina za mikroorganizme protočnom citometrijom ..	86
<b>6.8</b>	<b>Fluorescentna mikroskopija</b>	<b>87</b>
<b>6.9</b>	<b>Analiza kinetike vezivanja lektina za mikroorganizme</b>	<b>87</b>
6.9.1	Aktivacija LNB-karboksilnog čipa	87
6.9.2	Fiksiranje bakterija na LNB-karboksilni čip	88
6.9.3	Analiza kinetike vezivanja QCM metodom	88
<b>7.0</b>	<b>Statistička analiza</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>90</b>
	<b>OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE ...</b>	<b>I</b>
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	<b>Ii</b>
	<b>IZJAVA O AUTORSTVU</b>	<b>iii</b>
	<b>IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA</b>	<b>iv</b>
	<b>IZJAVA O KORIŠĆENJU</b>	<b>v</b>

## 1. UVOD

Interakcija između mikroorganizama i domaćina je ključni događaj u inicijaciji i progresiji infektivnih bolesti, i upravo zato su one predmet mnogobrojnih istraživanja. Pored potrebe da se mikroorganizmi identifikuju i okarakterišu, a u svrhu razumevanja međusobnog kontakta mikroorganizama sa domaćinom, pojavila se i potreba za karakterizacijom molekula koji se predstavljaju medijatore u ovoj interakciji.

Površina mikroorganizama prekrivena je brojnim glikanima, oligo ili polisaharidnim molekulima, vezanim za proteine ili lipide na ćelijskoj membrani. Upravo ti glikani, nastali procesom glikozilacije, odgovorni su za komunikaciju između mikroorganizama i ćelija domaćina. Pored toga što je površina mikroorganizama prekrivena velikim brojem glikana, površina ćelija domaćina takođe poseduje veliki broj različitih glikanskih struktura.

Glikozilacija proteina je ne samo najzastupljenija posttranslaciona modifikacija u prirodi, već i jedna od najbitnijih. Do skoro se smatralo da je zastupljena samo u eukariotama, a zatim je pokazano da je zastupljena u sva tri carstava života: *Eukarya*, *Bacteria* i *Archaea*.

Brojne naučne studije pokazale su da glikani poseduju visok stepen strukturne raznovrsnosti i upravo to im omogućava visoko specifične interakcije na molekulskom nivou kako između ćelija, tako i sa različitim solubilnim faktorima. Svaki individualni organizam može eksprimirati unikatne glikane, koji mogu poslužiti za razlikovanje sopstvenog organizma od drugih organizama. Ovo tvrđenje se lepo ogleda u postojanju različitih krvnih grupa u humanoj populaciji. Zbog kompleksnosti i diverziteta procesa glikozilacije kao i potrebe za visokim nivoom specijalizacije za upotrebu analitičkih metoda, istraživanja vezana za proučavanje glikanskih struktura veoma dugo nisu bila u fokusu naučne zajednice. Istraživanja s kraja XX veka otkrila su razlike u glikozilaciji u različitim patološkim stanjima.

Upravo to je označeno kao razlog aktivnog razvoja glikomike – novog istraživačkog polja koje se bavi proučavanjem struktura polisaharida i glikokonjugata.

Najvažnije metode za analizu glikana su tačna hromatografija i masena spektrometrija. Obe metode pouzdano određuju glikanske determinante ali imaju nekoliko mana: zahtevaju izuzetno skupu opremu, visoko kvalifikovano osoblje; odlikuje ih komplikovan postupak pripremanja uzorka, kao i ograničena mogućnost simultane analize većeg broja uzoraka. Zato su mnogi istraživači krenuli u potragu za alternativnim načinima detekcije glikanskih struktura i kao jedan od alternativnih pristupa nametnula se upotreba lektina sa poznatim afinitetima prema odgovarajućim glikanskim strukturama.

Metode koje se baziraju na upotrebi lektina omogućavaju simultano istraživanje velikog broja ovih biomolekula i ćelijske glikozilacije, čime su prevaziđene neke

poteškoće tradicionalnih metoda i omogućena je šira primena identifikacije i analize glikana u istraživanjima.

Lektini pripadaju grupi proteina koji su sposobni za relativno selektivno vezivanje polisaharidnih komponenti na površini ćelija, koje zavisi od specifičnosti samog lektina, pri čemu ne dolazi do ispoljavanja bilo kakve enzimske aktivnosti. Navedena karakteristika lektina može se upotrebiti za detekciju dostupnih glikanskih struktura. Površinski omotači svih mikroorganizama sadrže različite polisaharide, kao što su: manoza, galaktoza, fukoza,

sijalinska kiselina, N-acetilglukozamin i N-acetilgalaktozamin, i upravo oni su meta vezivanja lektina. S obzirom da je i većina sekretovanih i površinski eksprimiranih proteina modifikovana glikozilacijom pokazano je da upravo lektini mogu imati bitnu ulogu u analitici.

Većina lektina ima afinitet prema većem broju šećera i upravo ta neselektivnost predstavlja potencijalno ograničenje upotrebe lektina. Međutim, ukoliko se paralelno analizira vezivanje više lektina različitih specifičnosti, ovo ograničenje ne mora predstavljati limitirajući faktor.

Fizičko-hemijske osobine lektina često im pružaju rezistenciju na digestivne enzime i otpornost na promene uslova okoline, kao što su ekstremne promene pH. Pored svega navedenog, lektini su često bogato zastupljeni u lako dostupnim prirodnim izvorima, što ih čini jednim od najrasprostranjenijih i najbolje okarakterisanih analitičkih molekula. Novija istraživanja pokušavaju da istraže i da li upravo na osnovu ovih karakteristika lektini mogu da budu iskorišćeni kao potencijalni medijatori delovanja različitih terapijskih supstanci.

Metode koje se baziraju na interakciji između lektina i polisaharida dozvoljavaju istraživačima da prevaziđu probleme separacije i prečišćavanja biomolekula koji sadrže polisaharide od interesa, a samim tim pružaju mogućnost karakterizacije glikoproteina, detekciju promene glikozilacije u zavisnosti od uslova sredine, kao i identifikaciju i definisanje novih lektina, mikroorganizama i ćelija, ali i promenu glikozilacije u tkivima zahvaćenim patološkim promenama, što je zabeleženo u mnogim kancerskim oboljenjima.

Osim toga, za razliku od klasičnih analitičkih metoda za analizu glikozilacije upotrebom lektina direktno dolazimo do podataka o prisustvu površinski dostupnih struktura na mikroorganizmima, tj. posredno i njihovom prostornom rasporedu, koje su samim tim dostupne i za prepoznavanje od strane antitela i drugih molekula koji učestvuju u odbrani od mikroorganizama. Definisanje glikozilacije površinskih struktura mikroorganizama pokazalo se važnim za serotipizaciju pneumokoka i kao koristan alat pri razvoju inovativnih vakcina za tretiranje i sprečavanje infekcija, ali i pri dizajniranju anti-infektivnih molekula.

## 2. OPŠTI DEO

Mikroorganizmi, kao što su virusi, bakterije i gljive široko su rasprostranjeni u našem okruženju, a mnogi od njih mogu biti patogeni i uzročnici infektivnih bolesti. Infektivne bolesti poput tetanusa, difterije, pertusisa, besnila, boginja, influence, korona virusa, predstavljaju ozbiljnu pretnju milionima ljudi širom sveta, iako se danas mnoge bolesti izazvane navedenim patogenima mogu sprečiti upotrebom vakcina.

Prema literaturnim podacima, pre pandemije SARS-CoV-2 2020. godine, infektivne bolesti su same bile odgovorne za oko 50,000 smrtnih slučajeva dnevno širom sveta, što je oko 35% ukupne smrtnosti godišnje. Iz tog razloga neophodna su dodatna istraživanja koja bi pomogla da se infektivne bolesti dovedu pod kontrolu. Blagovremena detekcija patogena kod simptomatskih ali i asimptomatskih individua ili na mestima potencijalnih širenja patogena, kao i visoko senzitivna identifikacija patogena ključna je u očuvanju zdravlja ljudi i može pomoći u kontroli ili sprečavanju lokalnih epidemija i globalnih pandemija, što je pogotovu bilo evidentno u slučaju novog patogena, kao što je SARS-CoV-2.

Kroz istoriju infektivne bolesti su pogađale ljudsku vrstu, sve do polovine 20-tog veka, kada se, pojavom antibiotika, desila revolucija na polju medicine. Iako je prvi antibiotik, arsfenamin, upotrebljen 1910. godine, kao prvi efektivni tretman za sifilis, tek 1928. godine i pronalaskom penicilina, počinje široka upotreba antibiotika koja svoj vrhunac dostiže između 50. i 60. godina prošlog veka<sup>1</sup>. Od tog vremena, antibiotici su spasili milione života, međutim, bez obzira na uticaj koji su imali i imaju u lečenju bakterijskih infekcija, postojanje antibiotika prate i izvesni nedostaci koji se moraju prevazići. Jedan od najvećih izazova u medicini danas je pojava i širenje patogenih bakterijskih sojeva koji su rezistentni na antibiotike, npr. 2002. godine, u bolnicama u Americi, na odelenjima intenzivne terapije preko 50% *Staphylococcus aureus* izolata bilo je rezistentno na meticilin<sup>2</sup>. Pošto je u lečenju infekcija takvim sojevima korišćen vankomicin povećan je selektivni pritisak na razvoj rezistencije na vankomicin<sup>2</sup>.

Baš iz tog razloga, mnoga ispitivanja u biomedicinskim naukama imaju za cilj traženje rešenja da se prevaziđe ovaj izazov. Prvobitno se radilo na proširenju spektra delovanja prve generacije antibiotika s obzirom da je veliki broj antibiotika bio uskog spektra kliničke upotrebe i nije delovao na organizme koji proizvode beta-laktamaze, i koji zbog toga imaju sposobnost inaktivacije penicilina. Stoga su dizajnirani antibiotici druge generacije koji su imali proširen spektar upotrebe na *E.coli*, *P. mirabilis*, *H. Influenzae*. Međutim, ovaj pristup je ukazao na veliku manu antibiotika, a to su neželjena dejstva na prirodnu mikrofloru domaćina koja igra važnu ulogu u zdravlju domaćina<sup>3</sup>. Upravo, iz tog razloga istraživanja su išla i ka razvijanju antibiotika uskog spektra, odnosno antibiotika specifičnih za određene vrste ili sojeve bakterija, koji će usporiti evoluciju i širenje antibiotske rezistencije, smanjivanjem šanse za transfer gena koji su odgovorni za rezistenciju.

Međutim, vreme predstavlja problem u navedenim istraživačkim pristupima. Naime, trajanje razvoja, zatim proizvodnje, kliničkih ispitivanja i distribucije novih antibiotika je dugo i meri se godinama, a za to vreme povećava se prisustvo bakterija koje mutiraju i stvaraju nove rezistentne sojeve.

Pored razvijanja inovativnih antibiotika uskog spektra delovanja i uzimajući u obzir ograničenja antibiotika prve generacije, bilo je potrebno pristupiti detaljnijim istraživanjem mehanizama rezistencije i potencijalnim načinima inaktivacije ovih mehanizama<sup>4,5,6</sup>. Paralelno

sa definisanjem mehanizama rezistencije, bilo je potrebno razvijati i brže, preciznije i pouzdanije dijagnostičke metode koje će detektovati specifični patogen, odgovoran za infekciju.

Kao jedan od potencijalnih ciljeva novih terapija nameću se površinski glikani mikroorganizama. Više studija je pokazalo da su upravo oni odgovorni za patogenezu i da svaka vrsta ili soj mikroorganizama poseduje unikatnu površinsku glikansku strukturu<sup>7</sup>. Tradicionalni pristupi u ciljanju bakterijskih glikana u profilaktičke ili terapijske svrhe su imali veoma veliki uspeh u kliničkoj praksi<sup>8</sup>. Tu se prvenstveno misli na vakcine bazirane na bakterijskim saharidnim epitopima koje se koriste za imunizaciju dece od bakterijskih patogena kao što su *Neisseria meningitidis* (Menactra), *Streptococcus pneumoniae* (Prevnar) i *Haemophilus influenzae* (Act-HIB)<sup>9</sup>. Međutim, iako je vakcinacija vrlo uspešna preventivna mera, ona ne pomaže individuuama koje već boluju od neke bakterijske, fungalne ili virusne infekcije.

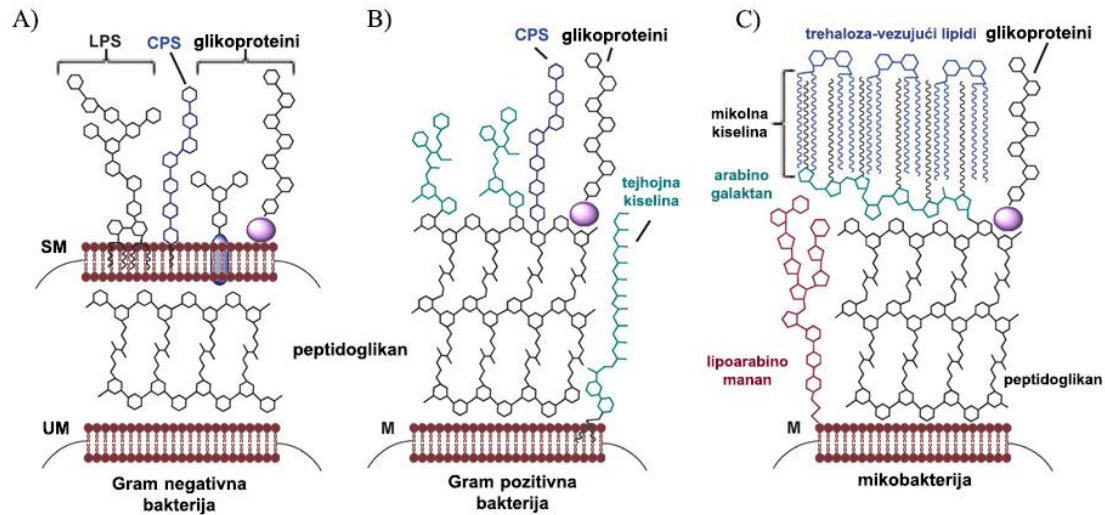
Rezultati pojedinih istraživanja pokazuju da je najefikasniji pristup razvijanja terapeutika i dijagnostičkih metoda baziran na ekspresiji retkih monosaharida, nastalih procesom glikozilacije, na površini mikroorganizama<sup>7</sup>. Poznavanje i detekcija glikanskih struktura prisutnih na površini mikroorganizama stoga, osim fundamentalnog, može imati i praktičan značaj.

## 2.1 Struktura bakterijskog ćelijskog zida

Ćelijski zid bakterija je multifunkcionalan ali je njegova osnovna funkcija u zaštiti bakterije, prvenstveno od uticaja okruženja i promena osmotskog pritiska. Pored ove uloge, ćelijski zid bakterija prekriven je različitim strukturama koje su odgovorne za infekciju domaćina. Upravo iz ovog razloga ćelijski zid je glavna meta antibiotika.

Većina bakterija se grupiše u tri kategorije, na osnovu strukture ćelijskog zida: Gram negativne, Gram pozitivne i Mikobakterije<sup>10</sup>. Gram negativne bakterije poseduju dve ćelijske membrane, sastavljene od različitih peptidoglikana, lipopolisaharida (LPS) i kapsularnih polisaharida (engleski: Capsular polysaccharide CPS) (**Slika 2.1A**)<sup>11</sup>. Gram pozitivne bakterije imaju samo jednu ćelijsku membranu, a na površini pored gusto pakovanih peptidoglikana, glikoproteina i CPS, poseduju, umesto LPS-a, tejhajnu kiselinu koja je u zavisnosti od vrste bakterije ili kovalentno vezana sa peptidoglikanima ili usidrena u ćelijsku membranu (**Slika 2.1B**)<sup>12</sup>. Uopšteno govoreći ćelijski zid Gram pozitivnih bakterija je šira i rigidnija struktura od ćelijskog zida Gram negativnih bakterija, što im pruža bolju mehaničku zaštitu.

Treću kategoriju čine Mikobakterije. Njihov ćelijski zid poseduje samo jednu membranu, koja je pokrivena gustim slojem peptidoglikana, kao što je to slučaj i kod Gram pozitivnih bakterija, ali se uz taj sloj peptidoglikana nalazi i sloj lipoarabinomanana, na koji se kasnije nadovezuje arabinogalaktan za koji je vezana mikolna kiselina na čijem su kraju vezani trehaloza-vezani lipidi, što ovoj vrsti bakterija pruža zaštitni hidrofobni sloj (**Slika 2.1C**)<sup>13</sup>.



**Slika 2.1. Šematski prikaz strukture bakterijskog ćelijskog zida**

A) Gram negativne bakterije; B) Gram pozitivne bakterije; C) Mikobakterije<sup>10</sup>.

Ćelijski zid određenog broja Gram negativnih i Gram pozitivnih bakterija prekriven je bakterijskom kapsulom. To je hidratizirani polisaharidni omotač koji prekriva spoljašnji omotač ćelijskog zida bakterija. Kod većine bakterija, kapsula se sastoji od monosaharida koji su međusobno povezani glikozidnim vezama<sup>14</sup>. Kapsula ima zaštitnu ulogu, tako što sprečava sušenje bakterija, ali i štiti bakteriju od fagocitoze i delovanja raznih ćelija imunskog sistema. S obzirom da je bakterijska kapsula u direktnom kontaktu sa spoljašnjim okruženjem upravo ona ima bitnu ulogu u virulenci i infekciji različitih patogenih bakterija<sup>15, 16</sup>.

## 2.2 Struktura fungalnog ćelijskog zida

Ćelijski zid gljiva je esencijalna struktura koja se nalazi sa spoljne strane plazma membrane i odgovoran je za održavanje celularnog integriteta i vijabilnosti kao i za interakcije ćelije sa okruženjem. Celijski zid gljiva strukturiran je u više nivoa, gde je unutrašnji nivo najkonzervativniji, dok su spoljašnji nivoi ti koji dosta variraju između vrsta.

On ima bitnu ulogu u različitim biološkim funkcijama, kao što su kontrola permeabilnosti i zaštita ćelije od osmotskih i mehaničkih uticaja<sup>17, 18</sup>. Pored ovih uloga, ćelijski zid ima bitnu ulogu u interakcijama sa spoljašnjom sredinom preko adhezina i velikog broja receptora koji nakon njihove aktivacije pokreću kompleksnu kaskadu signala unutar ćelije<sup>17</sup>.

Ćelijski zid gljiva je kompleksna struktura koja se sastoji od proteina povezanih sa polisaharidima (glikoproteina), dok je najbitniji strukturni polisaharid glukan i on predstavlja između 50 i 60% ove strukture. Najveći broj polimera glukana sastoji se od 1,3 vezivnih glukanskih jedinica, ali registrovani su i glukani poput  $\beta$ -1,6,  $\beta$ -1,4;  $\alpha$ -1,3 i  $\alpha$ -1,4<sup>19</sup>, a zastupljeni i hitin, hitozin, različiti lipidi i pigmenti.

Ključna strukturna komponenta ćelijskog zida većine gljiva je  $\beta$ -1,3-D- glukan i za nju su kovalentno vezane ostale komponente ćelijskog zida. Za sintezu ovog polisaharida odgovoran je kompleks enzima koji se nalaze na plazma membrani, i zovu se glukan sintetaze<sup>20,21</sup>.

Pored glukana, ćelijski zid gljiva poseduje i hitin. Hitin se sintetise iz N – acetilglukozamina pomoću enzima hitin sintetaze, a njegova zastupljenost u ćelijskom zidu varira u zavisnosti od morfološke faze u kojoj se gljiva nalazi<sup>22</sup>. Većina ostalih proteina su povezani sa polisaharidima preko O- i N- veze i imaju širok spektar uloga od održavanja oblika ćelija, učestvuju u adhezivnim procesima, zaštiti od različitih supstanci, absorpciji molekula, signalnoj transmisiji, sintezi i reorganizaciji komponenti ćelijskog zida<sup>17,23</sup>.

Bitno je napomenuti da veliki broj gljiva u svom ćelijskom zidu sadrži polimer melanina, pigment visoke molekulske mase koji je delom negativno naelektrisan, a delom hidrofoban i nerastvorljiv u vodenim rastvorima<sup>24</sup>. Melanin ima ulogu u zaštiti gljiva od različitih uticaja okruženja time što povećava otpornost prema uticajima okoline kao što su ekstremne temperature, UV svetlost i toksini<sup>25,26</sup>, ali registrovano je i njegov uticaj na fungalnu virulencu<sup>27</sup>.

S obzirom da komponente ćelijskog zida gljiva ne postoje kod ljudi, ove strukture su idealne mete za antifungalnu terapiju.

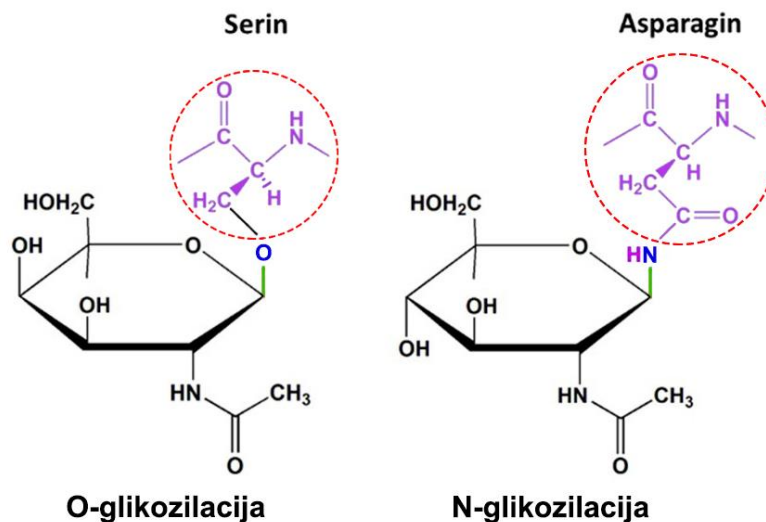
### 2.3 Glikozilacija i glikanske strukture na površini mikroorganizama

Ćelije mikroorganizama su prekrivene različitim glikanskim strukturama koje su sastavni deo njihovog ćelijskog zida ili kapsida. Pored svih prethodno navedenih razlika u strukturi bakterijskog ćelijskog zida, postoji još jedna dodatna i ključna razlika, a to je sinteza i zastupljenost glikolizovanih proteina<sup>8,13</sup>.

Reč „glikomika“ (engleski: Glycomics) je relativno nova reč koja se koristi u literaturi poslednjih godina i odnosi se na novu granu glikobiologije koja se bavi proučavanjem strukture i funkcije kompletnog seta glikanskih struktura koji su sastavni deo neke ćelije i identifikacijom gena koji kodiraju glikoproteine. Ključni proces koji izučava glikobiologija, a i glikomika je glikozilacija. Glikozilacija je jedna od najkompleksnijih posttranslacionih modifikacija proteina, uključena u čak 50 do 70% svih celularnih procesa<sup>28</sup>. U ljudskom telu velika većina proteina i lipida je modifikovana upravo procesom glikozilacije<sup>29</sup>. Tokom ovog procesa, saharidi se kovalentno vezuju za membranske i/ili sekretorne proteine i to konkretno za asparagin (Asp), hidroksilizin, serin (Ser) ili treonin (Thr), formirajući glikoprotein<sup>30</sup>. Prirodna modifikacija jednog proteina varira od vrste do vrste, od lokacije u kojoj se u ćeliji ili tkivu eksprimira i ukupnog fiziološkog ili patološkog stanja organizma.

Postoji širok spektar funkcija koje saharidna komponenta na proteinu može obavljati, a najbitnije funkcije koje podrazumevaju učestvovanje specifičnih oligosaharida su prepoznavanje proteina od strane drugih proteina i zaštita proteina zaklanjanjem određenih delova čime se blokira mogućnost nespecifičnih interakcija i efekat raznih enzima<sup>31</sup>.

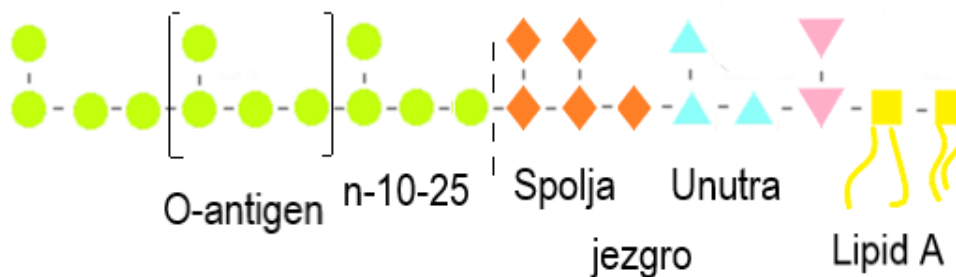
Glikozilacija proteina se uglavnom pojavljuje po tipu N-glikozilacije ili O-glikozilacije<sup>32</sup>. Vezivanje šećera za asparagin u konsenzus sekvenci Asp-X-Ser/Thr predstavlja N-glikozilacija, gde X može biti bilo koja amino kiselina sem prolina. Sa druge strane, vezivanje šećera za Ser ili Thr je O-glikozilacija. Pri nastanku ovih interakcija učestvuje hidroksilna grupa aminokiselinskog ostatka ali ne postoji konsenzus sekvencija na kojoj se ovo događa. Šećeri nastali O-glikozilacijom poseduju najmanje 8 različitih osnovnih struktura, zakačenih preko N-acetilgalaktozamina na Ser ili Thr, koji se kasnije produžavaju dodatkom monosaharida. Pored aminokiselina Ser i Thr, u formiranju O-glikozilacije mogu učestvovati i tirozin (Tyr), hidroksilizin ili hidroksiprolin (**Slika 2.2**)<sup>33,34</sup>.



Slika 2.2. Šematski prikaz razlike između O- i N- glikozilacije

Do pre dve decenije mislilo se da se N-vezujuća glikozilacija pojavljuje samo kod eukariota, a zatim je dokazana u Gram negativnim patogenim bakterijama *Campylobacter jejuni*, a potom i kod mnogih drugih vrsta bakterija, archaea i virusa<sup>35, 36</sup>. Međutim, N-glikozilacija mnogo češća kod archaea, dok je O-glikozilacija češća kod bakterija, a O-vezujući glikoproteini se pojavljuju u različitim oblicima, i sa visokim stepenom varijacije između i unutar vrsta. Kao što je ranije pomenuto, sve tri kategorije bakterijskih ćelija na svojoj površini prekrivene su glikanima, od kojih su mnogi specifični upravo samo za bakterije, kao recimo pseudaminska kiselina se pojavljuje samo u malom broju patogenih bakterija, dok uopšte nije detektovana u ćelijama sisara<sup>37, 38</sup>.

Kod Gram pozitivnih bakterija javlja se citoplazmatska O-glikozilacija, koja je zapravo alternativni put oligo-saharil-trasferazom posredovane O-glikozilacije, koja je široko rasprostranjena kod Gram negativnih bakterija koje ekspiriraju ovaj enzim<sup>39</sup>. LPS, koji je glavna komponenta Gram negativnih bakterija, npr. *E. coli*, ekspiriran je na površini ćelije i sastoji se od različitih šećera vezanih za O-antigen, koji je vezan za hidrofobnu membranu u koju je uronjen Lipid A (endotoksin) (Slika 2.3).



**Slika 2.3. Šematska struktura lipopolisaharidnog molekula enterobakterije sa različitim saharidnim reziduama.** Lipidi su prikazani kao isprekidana linija, a šećerne rezidue na sledeći način: GlcN (■), Kdo (▼), heptoza (▲), heksoza (◆), i komponenta O-antigena (●), najzastupljenije heksoze<sup>40</sup>.

Geni odgovorni za sintezu O-antigena se nalaze na istom hromozomu kao O-antigen genski klaster i strukturna varijacija O-antigena se poklapa sa genskim varijacijama detektovanim u ovom klasteru. Upravo zato se O-antigen se odlikuje visokom varijabilnošću i vrlo je koristan za identifikaciju različitih sojeva unutar jedne vrste. Na primer *Salmonella enterica* sintetizuje 54 O-antigena zbog čega postoje 54 različita serotipa *S. enterica*, dok *E. coli* sintetizuje 181 O-antigen, a samim tim ovu bakteriju karakteriše postojanje i daleko većeg broja serotipova od *S. enterica*<sup>41,42</sup>.

Mnogobrojne studije su pokazale da upravo glikani igraju ključnu ulogu u regulaciji mnogih životnih procesa, kao što su međucelijske interakcije, ćelijski rast, ćelijska diferencijacija, apoptoza, ali i za interakciju između ćelija domaćina i patogena<sup>43-47</sup>. Kod mnogih mikroorganizama glikoproteini su odgovorni, pored navedenog i za kretanje i zaštitu od uticaja spoljašnje sredine. Pokazano je da u slučaju defektnog formiranja glikana bakterijske ćelije mogu da podlegnu promenama osmotskog pritiska<sup>48</sup>, dok Gram pozitivne bakterije kod kojih je registrovano odsustvo tejhodne kiseline nisu sposobne za infekciju<sup>49</sup>.

Detaljnijom analizom ovih glikanskih struktura na površinama mikroorganizama otkrivene su karakteristične površinske strukture, koje mogu biti specifične za vrstu ili soj, a detektovana je i razlika u zastupljenosti njihovih monosaharida u zavisnosti od toga da li je mikroorganizam patogen ili ne<sup>8</sup>. Pa je tako, na primer, većina bakterijskih ćelija prekrivena peptidoglikanima koji predstavljaju mrežu  $\beta$ -1,4-N-acetilglukozamida (GlcNAc) i N-acetilmuraminske kiseline (MurNAc).

GlcNAc je široko zastupljen i kod prokariota i kod eukariota, dok je MurNAc zastupljen samo kod prokariota, pa bi, samim tim i terapeutik ili marker koji cilja MurNAc imao bi uticaj na prokariote koje ga poseduju. Navedeni princip se može primeniti i na Gram negativne bakterije s obzirom da samo one sintetizuju LPS, koji sadrži specifične monosaharide: 3-deoksi-D-mano-okto-2-ulozonsku kiselinu (Kdo) i L-glicero-D-manoheptozu (heptozu)<sup>50</sup>, pa će tako terapeutici ili markeri za dijagnostiku koji ciljaju ove strukture imati uticaj samo na Gram negativne bakterije. Sa druge strane, Gram pozitivne bakterije poseduju tejhodnu kiselinu pa će ono što cilja nju uticati samo na Gram pozitivne bakterije. Međutim, ovo bi bile strategije delovanja na široki spektar različitih klasa mikroorganizama.

U cilju razvijanja specifičnih terapeutika i dijagnostičkih metoda, istraživači se okreću retkim saharidima koji se prezentuju na površinama mikroorganizama i mogu da se iskoriste kao identifikacione oznake u obeležavanju ili identifikaciji proteina na površini ćelija. Na primer, *Pseudomonas aeruginosa* na svojoj površini ima N-acetil-fukozamin (FucNAc) rezidue<sup>51</sup>, *Neisseria meningitidis* ima 2,4-diacetoamido-2,4,6-trideoksiheksozu (DATDH)<sup>52</sup>, *Campylobacter jejuni* i *Helicobacter pylori* imaju amino- i deoksi-monosaharide pseudoamininske kiseline, legionamininske kiseline i bacilozamin<sup>13,53</sup> i upravo ovi šećeri imaju ograničenu ekspresiju samo na patogenim bakterijama<sup>53, 54</sup>, dok sa druge strane ovi monosaharidi nisu sastavni deo glikana bakterija koje čine ljudski mikrobiom kao što su *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp..

Iz svega navedenog možemo zaključiti da površinski glikani mikroorganizama imaju jedno bitno svojstvo, a to je da mogu biti unikatni i da mogu posedovati šećere kojih nema u ljudskim ćelijama ili ćelijama životinja od značaja za ljude, što ih čini idealnim metama u dijagnostici ili za razvijanje novih terapeutika.

## 2.4 Lektini

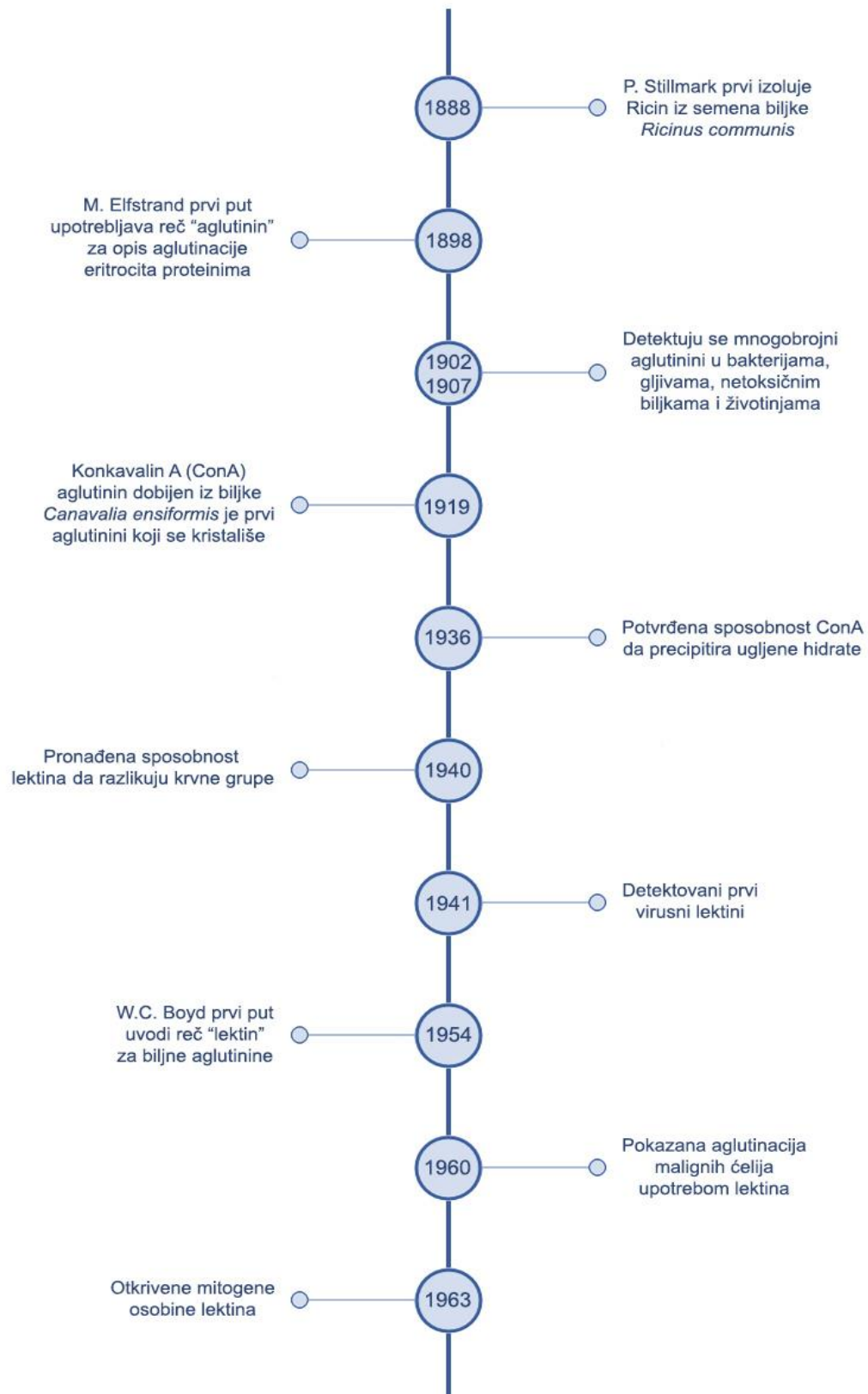
Lektini su među najproučavanijim molekulima u glikobiologiji, posebno u oblasti biljne glikobiologije. Reč “lektin” potiče od latinske reci “legere”, što znači “odabrati”. Prvi put otkriveni su u biljkama, a kasnija istraživanja pokazala su da se nalaze i u životinjama, i u mikroorganizmima<sup>55</sup>. Do sada je otkriveno više od 300 lektina, u skoro svim živim bićima, od virusa i bakterija do biljaka i životinja.

### 2.4.1 Istorija istraživanja lektina

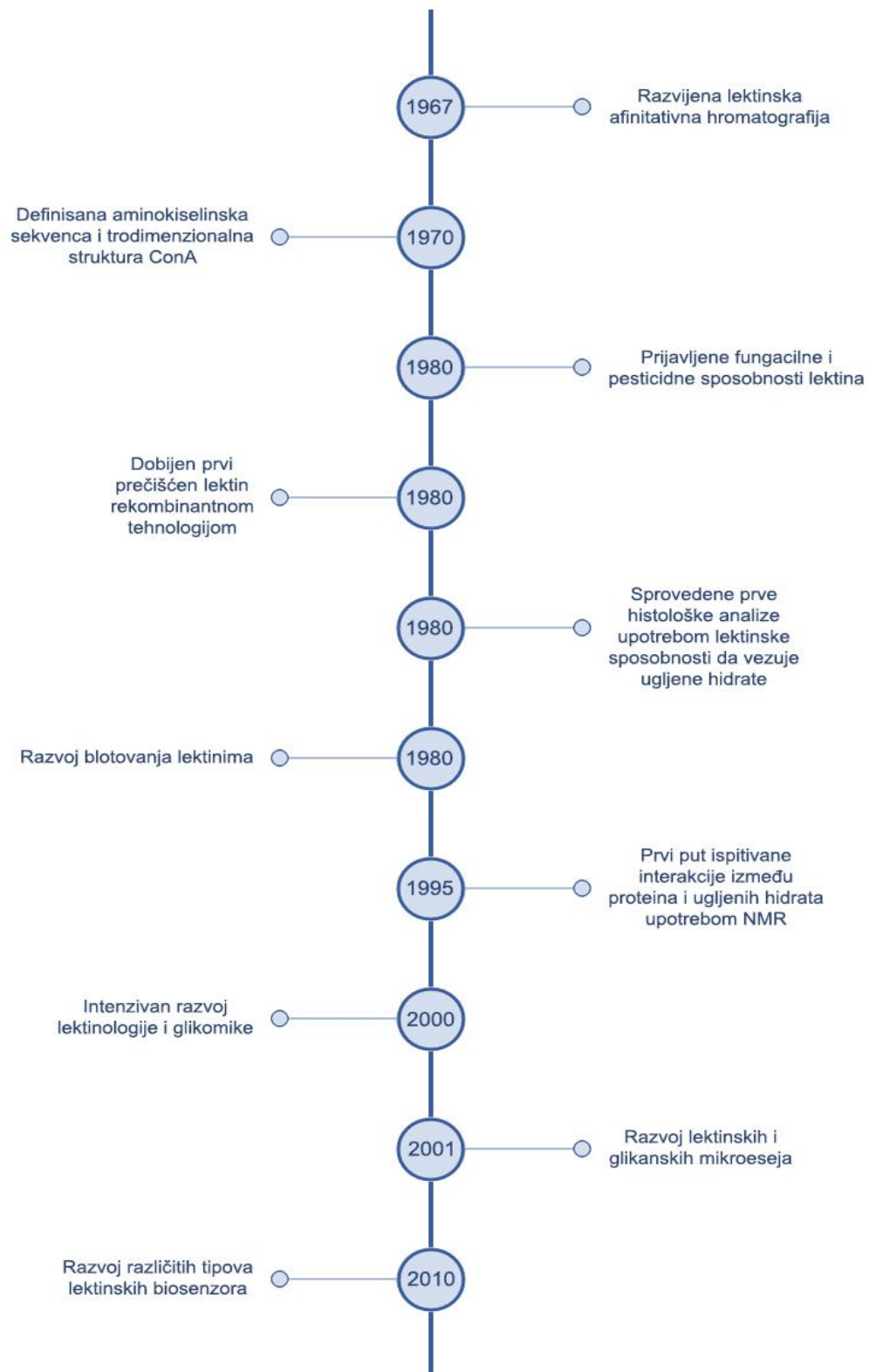
Prvi lektin izolovan je krajem XIX veka iz semena ricinusa (lat. *Ricinus communis*), kao komponenta koja ima mogućnost aglutinacije eritrocita<sup>56</sup>, ubrzo nakon toga izolvan je i lektin abrin iz biljke Rakovo oko (lat. *Abrus precatorius*) koji je skoro pa identičan toksinu koji produkuje *Ricinus communis*. Početkom XX veka potvrđeno je prisustvo lektina i u mnogim drugim živim organizmima, kao što su bakterije i životinje, a ubrzo nakon toga, već 1907. godine detektovani su u netoksičnim biljkama i gljivama<sup>57</sup>.

Prvi prečišćeni lektin je konkanavalin A (ConA), dobijen još 1919. godine iz mahunarke “*jack beans*” (lat. *Canavalia ensiformis*)<sup>55</sup>, tek 1936. godine uočena je sposobnost lektina da precipitiraju strukture sa ugljenim hidratima. Upravo ovo otkriće označava početak osnivanja glikobiologije kao nezavisne grane bioloških nauka (**Slika 2.4**). Početkom XX veka potvrđeno je prisustvo lektina i u mnogim drugim živim organizmima<sup>56, 57</sup>.

Glikobiologija obuhvata istraživanje strukture glikana, njihovu sintezu, degradaciju, ulogu u različitim biološkim sistemima i procesima; i proučava interakcije između ugljenih hidrata i proteina<sup>58</sup>.



Slika 2.4. Istorija istraživanja lektina



**Slika 2.4. Nastavak**

### 2.4.2 Definicija i uloga biljnih lektina

U lektine spadaju strukturno raznovrsni proteini, od kojih su neki i sami glikoproteini. Nalaze se u svim živim organizmima. Svi lektini imaju specifični afinitet vezivanja prema monosaharidima i/ili polisaharidima i saharidnim reziduama glikoproteina i glikolipida. To su proteini koji imaju sposobnost selektivnog, reverzibilnog vezivanja za molekule koje sadrže ugljene hidrate, pri čemu ne dolazi do ispoljavanja enzimske aktivnosti u vezujućem mestu, niti do promene strukture ugljenih hidrata za koje se vezuju<sup>59, 60, 61</sup>. Takođe, molekuli antitela ne spadaju u grupu lektina, iako zadovoljavaju navedene karakteristike. Upravo, iz prethodno navedenih razloga lektini pripadaju grupi "carbohydrate-binding proteins, CBP", ali ono po čemu se razlikuju od ostalih CBP-a je sposobnost aglutinacije ćelija<sup>62</sup>.

U zavisnosti od prisustva i zastupljenosti lektini imaju mnogobrojne uloge u različitim biološkim sistemima i biološkim procesima. Osnovno svojstvo lektina u svim živim organizmima je biološko prepoznavanje i vezivanje za ugljene hidrate koji se nalaze na površini ćelija i njihov transport ili skladištenje<sup>63</sup>. Na osnovu ovog svojstva lektini mogu imati ulogu u: sintezi i transportu proteina, fotosintezi, oplodnji, proliferaciji ćelija, metastazi tumora, formiranju imunskog odgovora, interakciji ćelija domaćina i patogena, apoptozi, itd.<sup>64-68</sup>.

Prva otkrivena mogućnost primene lektina bila je u određivanju krvnih grupa<sup>69</sup>, dok su kasnije našli primenu u raznim histohemijskim i citohemijskim metodama za detekciju i ciljanje specifičnih oligosaharidnih sekvenci pri tipiziranju ćelija, karakterizaciji ugljenih hidrata, ali i detekciji glikokonjugata u unutarćelijskim organelama, ćelijama i tkivima<sup>70</sup>. Danas se često koriste u separaciji i prečišćavanju glikoproteina, glikopeptida i oligosaharida i to uglavnom pomoću afinitetne hromatografije<sup>71</sup>.

Biljni lektini su se nametnuli kao najzastupljeniji i najdostupniji lektini u istraživanjima, između ostalog i usled činjenice da su neke biljne vrste izvori bogati lektinima. U samim biljkama, lektini igraju značajnu ulogu u klijanju, razvoju semena i korena, rastu, rezistenciji, transportu i skladištenju ugljenih hidrata<sup>72</sup>. DLL-II lektin, recimo, specifično se vezuje za kinetin i indol sircetnu kiselinu, koji su ključni hormoni uključeni u razvoj korena<sup>73</sup>. Žakalin, i lektini slični žakalinu imaju ulogu u rezistenciji biljke na patogene, abiotičkom stresu, kao i u razvoju biljaka<sup>74, 75</sup>. Mnogi biljni lektini imaju dobro poznate biološke aktivnosti poput, antibakterijskih, antifungalnih, antivirusnih i antikancerskih aktivnosti<sup>76</sup>.

Biljke sekretuju lektine kao sekundarne metabolite, koji se vezuju za površinu patogena i omogućavaju formiranje pora i promenu permeabilnosti ćelija, čime učestvuju u odbrani od patogena<sup>77</sup>. Antibakterijski mehanizam delovanja lektina uključuje inhibiciju ćelijskog rasta, izazivanje oštećenja u ćelijskom zidu, pri njihovom vezivanju za komponente ćelijskog zida, N-acetilmuraminsku kiselinu, N-acetilglukozamin, lipopolisaharida, što dovodi do formiranja pora u bakterijskom zidu, i do ćelijske smrti<sup>78</sup>. Ostvarivanjem interakcije između lektina i lipida A koji je deo LPS omotača Gram negativnih bakterija dolazi do povećane permeabilnosti spoljašnje membrane i smrti organizma. Neki lektini su sposobni da inhibiraju virusnu aktivnost vezivanjem za proteine na virusnom omotaču, blokirajući vezivanje za receptore ćelija domaćina ili vezivanjem za aktivno mesto virusne polimeraze. Na primer, lektin specifičan za D-manozu iz morskog koralu *Gerardia savaglia* reaguje sa oligosaharidnim bočnim lancima proteina omotača (gp120) HIV-1 i sprečava infekciju H9 ćelija HIV-1 virusom<sup>79</sup>, dok BanLec vezuje glikozilovane proteine omotača virusa (gp120) HIV-1 i time blokira ulazak virusa u ćeliju<sup>80</sup>. Pojedini biljni lektini koji imaju afinitet vezivanja manoze, poseduju aktivnost protiv koronavirusa. Oni interferiraju sa spajk virusnim proteinom, i time

utiču na vezivanje virusa u ranim fazama virusne replikacije i otpuštanja virusa na kraju virusnog ciklusa<sup>81</sup>.

Pored navedenog, mnogi lektini imaju citotoksične efekte, odnosno neki dovode do zaustavljanja ćelijske deobe i indukuju ćelijsku smrt npr. ćelija kancera različitog tipa. Takvi lektini, koji poseduju antikancerogenu aktivnost su generalno manje citotoksični prema nekancerogenim ćelijama, zbog varijacije glikanske ekspresije koja postoji na ćelijskim membranama zdravih ćelija i ćelija kancera<sup>82, 83</sup>. Pored sposobnosti biljnih lektina da razlikuju ćelije kancera od normalnih ćelija, oni imaju i osobinu razlikovanja benignih od malignih tumorskih ćelija na osnovu stepena glikozilacije, pa su ispitivani i kao sredstvo u dijagnostici tumora<sup>84</sup>.

### 2.4.3 Struktura lektina

Lektini su međusobno veoma raznovrsni i prepoznaju specifične mono- i oligosaharide. Oni mogu biti zastupljeni kao slobodni proteini ili mogu biti vezani za različite površinske strukture ćelija uz pomoć specifičnih mesta vezivanja<sup>57</sup>. Specifičnost lektina određena je njihovom trodimenzionalnom strukturom, odnosno amino kiselinskom sekvencom. Oni u svojoj strukturi imaju nekatalitički domen, koji vezuje specifične ugljene hidrate (engleski: carbohydrate-binding domain, CBD) monosaharide i oligosaharide. Većina poznatih lektina se karakteriše multimernošću i njihovi molekuli izgrađeni su od dve ili više vezanih subjednica, koje mogu biti identične, kao kod ConA ili različite, kao kod PHA. U zavisnosti od oligomernog stanja i tipa lektina mogu da imaju od 1 do 12 vezujućih mesta<sup>85</sup>.

Multivalentni lektini su sposobni da specifično prepoznaju i vežu šećere koji su eksprimirani na površini samo nekih tipova ćelija (kao što su eritrociti) što, kao posledica povezivanja ćelija rezultuje aglutinacijom<sup>86, 87</sup>. Sposobnost selektivne aglutinacije crvenih krvnih zrnaca pomoću lektina imala je svoju primenu u otkriću da su antigeni krvnih grupa po svom hemijskom sastavu ugljeni hidrati<sup>88</sup>. Sposobnost da se razlikuju krvne grupe u ABO sistemu krvnih grupa uz pomoć lektina otkrivena je u periodu između 1940. i 1950. godine.

### 2.4.4 Opšta klasifikacija lektina

Postoji više različitih tipova klasifikacije lektina i to na osnovu: porekla, lokalizacije u/na ćeliji, funkcije, strukture i sličnosti u sekvenci, organizaciji i broju vezujućih mesta i prema saharidnoj specifičnosti. Ovde je bitno napomenuti da se mnoge od ovih klasifikacija međusobno preklapaju.

Na osnovu porekla lektini su podeljeni u 5 velikih grupa na: biljne, životinjske, gljivične, bakterijske i virusne<sup>59</sup>.

Na osnovu lokalizacije u ćeliji lektini se dele na: ekstracelularne, intracelularne, lektine endopolazmatičnog retikuluma, lektine Goldžijevog kompleksa, citoplazmatske lektine i membranske lektine<sup>89</sup>.

Na osnovu funkcije koju vrše, lektini se mogu klasifikovati kao: hemaglutinini, adhezini, toksini, galektini, pentraksini, selektini i kolektini<sup>83</sup>.

Na osnovu strukture, klasifikacija lektina obuhvata: kalcijum zavisne lektine, galektine, lektine semena leguminoza, monokot-manoza vezujuće lektine, žakaline, lektine imunoglobulinskog tipa, manoza-6-fosfat receptore, pentraksine, fikoline, biljne lektine sa ricin B domenom, heparin vezujuće lektine, *Galanthus nivalis* (visisbaba) aglutinin i slične

lektine, kaleksin, F-box, amarantine, lektine sa fikolin fibrogen/kolagen domenom, heveine,  $\alpha$ -manozidaze, ricinu slične lektine, hitin lektine, *Nictaba* slične proteine, i dr<sup>61, 90, 91</sup>.

Na osnovu sekvence i evolucione sličnosti, lektini su klasifikovani na: lektine sa strukturom  $\beta$ -ploče, kalcijum zavisne lektine, lektine sa fikolin fibrogen/kolagen domenom, hijalin-adhezine, ricin lektine,  $\alpha$ -manozidaze, lektin žabljeg jajeta, lektin pšenične klice, lektin semena leguminoza, lektin zglavkara *Tachypleus tridentatus*, *Jacob* i slični lektini, beli luk i lektin visibabe (*Galanthus nivalis*), imunoglobulinska superfamilija lektina, itd.<sup>92, 93</sup>.

Lektini se klasifikuju i na osnovu organizacije i broja vezujućih mesta: monovalentne (merolektini)<sup>94</sup> bivalentne (hololektini), multivalentne (himerolektin i superlektin, lektin sa mestom za vezivanje dva strukturno različita ugljena hidrata)<sup>95</sup>.

Na osnovu specifičnosti vezivanja ugljenih hidrata lektini se dele na: glukoza vezujuće, manoza vezujuće, D-galaktoza vezujuće, L-fukoza vezujuće, sijalinska kiselina vezujuće, 2-acetamido-2-deoksi-galaktoza vezujuće, 2-acetamido-2-deoksi-glukoza vezujuće, N-acetil-D-galaktozamin vezujuće lektine<sup>95, 96</sup>.

#### 2.4.5 Klasifikacija biljnih lektina

Prva i osnovna klasifikacija biljnih lektina, koja je bila opšte prihvaćena bazirala se na vezivanju monosaharida. Prema ovoj klasifikaciji, lektini su podeljeni na:

- 1) manoza vezujuće,
- 2) galaktoza vezujuće,
- 3) hitin vezujuće i
- 4) ostale.

Međutim, istraživanja su pokazala da to nije bila adekvatna podela, jer nije uzimala u obzir strukturne karakteristike ne samo ugljnihhidratnih veza već ni molekula lektina. Razvojem genetskih analiza i sposobnosti da se dekodira struktura polipeptidnih lanaca u lektinskom molekulu, usvojena je druga klasifikacija, koja se zasniva na sličnostima sekvenci amino kiselina u ovim proteinima i strukturi domena za prepoznavanje ugljenih hidrata (engleski: carbohydrate-recognition domain-CRD).

Svaki CRD karakteriše jedinstvena aminokiselinska sekvenca, sa tipičnom uvijenom strukturom polipeptida i vezujućim mestom. U skladu sa time svi biljni lektini su podeljeni u 12 familija, prikazanih u **Tabeli 2.1**<sup>61, 80</sup>.

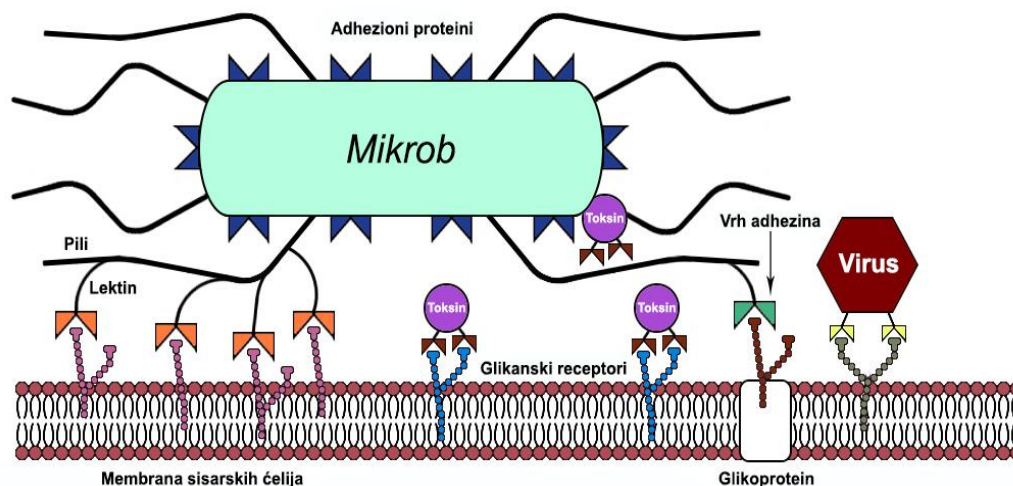
**Tabela 2.1. Porodice lektina poreklom iz biljaka i gljiva, prema Lannoo & Van Damme (2014)<sup>91</sup> i Lectin Frontier baza podataka (<http://acgg.asia/lfdb2/>).**

Familija biljnih lektina	Primer lektina	Molekulska struktura	Šećerna specifičnost
<i>Agaricus Bisporus</i> homolog	<i>Agaricus bisporus</i> aglutinin, <i>Xerocomus chrysenteron</i> aglutinin, <i>Pholiota squarrosa</i> lektin	$\beta$ -ploča	
Amarantin domen	<i>Amaranthus caudatus</i> aglutinin, <i>Amaranthus spinosus</i> aglutinin	$\beta$ -trefoil	D-Gal, GalNAc
Homolog klase V hitinaze	<i>Robinia pseudoacacia</i> aglutinin	TIM bure	GalNAc
Cijanovirin domen	<i>Ceratopteris richardii</i> lektin	trostruka $\beta$ -ploča i $\beta$ -ukosnica	Man
<i>Euonymus Europaeus</i> lektinski domen	<i>Euonymus europaeus</i> aglutinin	Nepoznata struktura	GalNAc, Gal, Fuc, Man, NeuAc, GlcNAc, Xyl, Glc
<i>Galanthus Nivalis</i> aglutinski domen	<i>Galanthus nivalis</i> aglutinin, <i>Hippeastrum hybrid</i> aglutinin, <i>Narcissus pseudonarcissus</i> aglutinin	$\beta$ -bure	D-Man
Hevein domen	<i>Datura stramonium</i> aglutinin, <i>Lycopersicon esculentum</i> lektin, <i>Phytolacca americana</i> aglutinin, <i>Solanum teberosum</i> aglutinin	Heveinska struktura	GlcNAc
Žakalin domen	Žakalin, artokarpin, <i>Maclura pomifera</i> aglutinin, <i>Helianthus tuberosus</i> aglutinin	$\beta$ -prizma	Glc, Man, Gal, GalNAc
Legume domen	ConA, DBA, LCA, PNA, SBA, <i>Wisteria floribunda</i> aglutinin, <i>Vicia villosa</i> aglutinin	$\beta$ -sendvič	Ara, Man, Glc, GlcNAc
Lysin motif (LysM) domen	<i>Pteris ryukyuensis</i> lektin, <i>Medicago truncatula</i> lektin	$\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ -struktura	Glc/Man
Nictaba-like domen	<i>Nicotiana tabacum</i> aglutinin, <i>Oryza sativa</i> lektin	Nepoznata struktura	GlcNAc
Ricin-B domen	RCA,MOA, SNA, SSA, <i>Trichosanthes japonica</i> aglutinin	$\beta$ -“detelina”	Gal, Glc

Novijim istraživanjima, ustanovljeno je da različiti CRD mogu da interaguju sa sličnim ugljenohidratnim strukturama, što je primer konvergentne evolucije<sup>97</sup>.

### 2.4.6 Specifičnost lektina

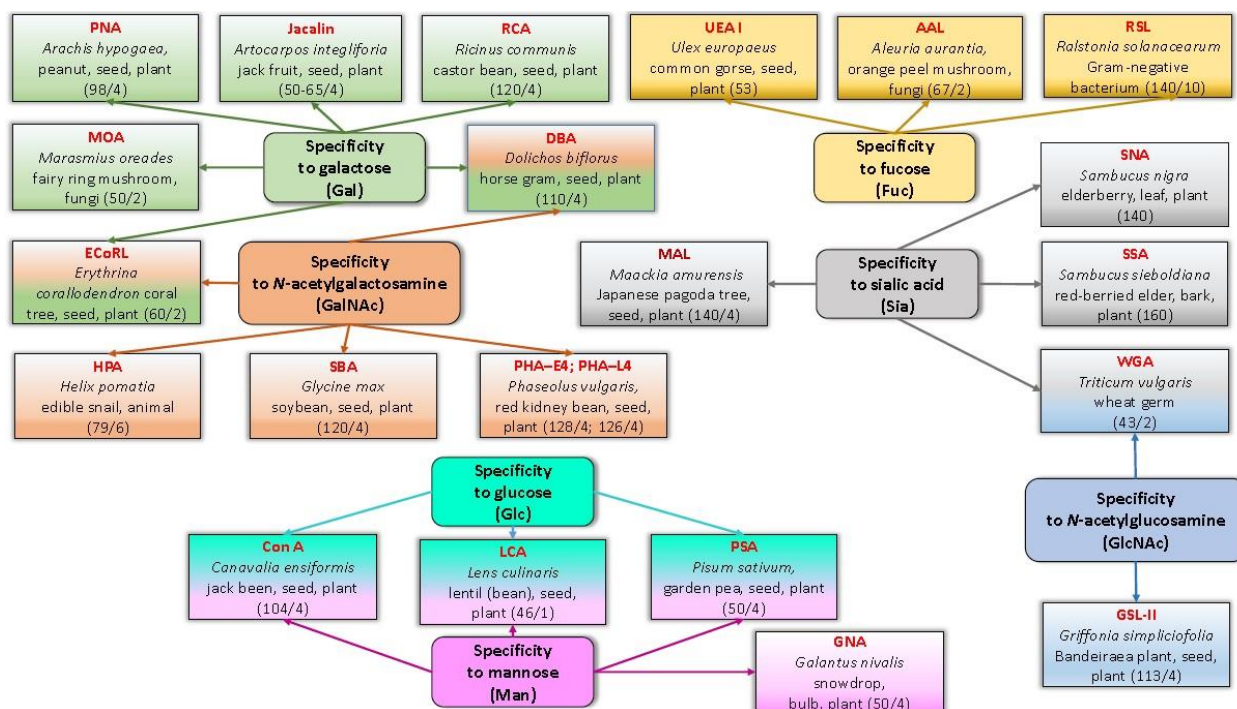
Najbitniji aspekt u određivanju kvaliteta lektina kao analitičkog alata je upravo njegova specifičnost. Lektini mogu da vezuju monosaharide, oligosaharide i polisaharide, kao i saharidne rezidue kompleksnih biomolekula kao što su, glikoproteini ili glikolipidi (**Slika 2.5**). Za razliku od antitela koja imaju afinitet za jedinstvenu antigensku determinantu, lektini nemaju tako visoku specifičnost. Prema literaturi, tipična konstanta asocijacije ( $K_a$ ) vezivanja lektina za ugljene hidrate je od  $10^{-3}$ - $10^{-7}$  M<sup>98,99</sup>. Razlog tome je što interakcija između ugljenih hidrata i lektina zavisi od mnogo faktora, kao što su valenca lektina, struktura vezivnog mesta, konformacija i dr.<sup>100</sup>. Multivalenca utiče na povećanje afiniteta lektina. Upravo zbog višestrukih interakcija, vezivanjem dodatnih mesta u molekulu ugljenog hidrata, naročito kad postoje repetitivne strukture i polivalence lektinskih subjedinica, selektivnost vezivanja ugljenih hidrata i lektina se povećava nekoliko puta, zbog čega neki istraživači navode da je aviditet polivalentnih interakcija između lektina i polisaharida uporediv sa aviditetom interakcija između antigena i antitela<sup>101, 102</sup>.



**Slika 2.5.** Priroda vezivanja patogena za saharidne rezidue na površini ćelije domaćina.

Lektini su specifični za neke strukture ugljenih hidrata, pa neki lektini mogu da interaguju samo sa manozom, glukozom (ConA, LCA), galaktozom (PNA, RCA), fuktozom (UEA), sijalinskom kiselinom (MAA) i dr.<sup>103-108</sup>. Tačke interakcije lektina takođe igraju bitnu ulogu, neki lektini interaguju samo sa terminalnim krajevima ugljeno-hidratnih ostataka u kompleksnim biomolekulima, dok drugi mogu da vezuju ostatke šećera unutar lanca polisaharida. Pored ovoga, mnogi lektini nisu specifični samo za anomernu formu šećernog molekula ( $\alpha$ - ili  $\beta$ - anomeri), već i za striktnu sekvencu ugljenohidratnih rezidua.

**Slika 2.6** prikazuje specifičnost nekih lektina prema *Lectin Frontier* bazi podataka. Svaki kvadrat na slici sadrži skraćenicu lektina i njegovo poreklo. Molekulska težina (kDa) i broj oligomera u molekulu lektina navedeni su u zagradama.



Slika 2.6. Specifičnost odabranih lektina  
(Lectin Frontier baza podataka)<sup>61</sup>

Pored stabilne strukture, širokog spektra različitih molekulskih masa i dostupnosti, upravo sposobnost vezivanja ugljenih hidrata čini ih interesantnim za laboratorijsku upotrebu<sup>109</sup>.

#### 2.4.7 Karakteristike lektina korišćenih u studiji

U ovoj studiji korišćeni su sledeći lektini: MAA, SBA, LCA, WGA, RCA<sub>120</sub>, ConA, SNA I i BanLec.

MAA - *Maackia amurensis* agglutinin, potiče iz semena biljke *Maackia amurensis* poznatije kao amurska makija. Spada u leukoaglutinine ili mitogene izolektine, ima molekulsku masu od 140 kDa i sastoji se od četiri subjedinice, sa izoelektričnom tačkom od 4,7. Postoje dva MAA lektina: MAL I i MAL II, oba se koriste za detekciju alfa 2-3 sialinske kiseline<sup>110</sup>.

SBA – *Soybean agglutinin*, je lektin koji potiče iz soje lat. *Glycine max*. Molekulska masa SBA je 120 kDa i sastoji se od četiri identične subjedinice od po 30 kDa. SBA ima specifičnost vezivanja N-acetil-D-galaktozamina i galaktopiranozilskih rezidua glikoproteina<sup>111</sup>.

LCA – *Lens culinaris* agglutinin lektin potiče iz biljke *Lens culinaris* ili *Lens esculenta* tj. iz sočiva, jestive mahunarke. Sastoji se iz četiri subjedinice – dve od po 17 kDa i dve od po 8 kDa. LCA prepoznaje sekvence koje sadrže  $\alpha$ -vezane manozne residue.  $\alpha$ -vezane fukozne residue povećavaju afinitet<sup>112</sup>.

WGA – *Wheat germ agglutinin*, potiče iz *Triticum vulgare* tj. pšenice. Ovaj lektin ima sposobnost reverzibilnog vezivanja N-acetil-D-glukozamina i sialinske kiseline glikoproteina i glikolipida. Ovaj lektin ima ulogu u zaštiti pšenice od različitih insekata, gljiva i bakterija.

WGA se sastoji od dve subjedinice i ima molekulska masu od 36 kDa. WGA ispoljava mitogenu aktivnost prema limfocitima, a ima sposobnost aglutinacije eritrocita i više tipova malignih ćelija<sup>113</sup>.

RCA<sub>120</sub> – *Ricinus communis agglutinin*, potiče iz semena biljke ricinus ili turske kudulje. RCA<sub>120</sub> je tetramerni hemaglutinin koji se sastoji od dve  $\alpha$  podjedinice, molekulske mase od po 27 kDa i dve  $\beta$  podjedinice, molekulske mase od po 33 kDa. RCA<sub>120</sub> pokazuje afinitet ka vezivanju galaktoze i N-acetilgalatozaminskih rezidua<sup>114</sup>.

ConA – Konkanavalin A je lektin iz mahunarki vrste *Canavalia ensiformis*. Con A je tetramer, gde svaka od subjedinica ima molekulska masu 26,5 kDa, vezuje metalni jon, uglavnom Mn<sup>2+</sup> ili Ca<sup>2+</sup>. Ima izoelektričnu tačku u opcegu od 4,5-5,5. Ovaj lektin specifično vezuje  $\alpha$ -D-manozne i  $\alpha$ -D-glukozne ostatke koji se, između ostalog, nalaze na terminalnim pozicijama  $\beta$ -glukana<sup>115</sup>.

SNA I – *Sambucus nigra agglutinin* je lektin izolovan iz kore zove. SNA I je tetramerni protein molekulske mase 140 kDa koji pokazuje afinitet vezivanja prema sijalinskoj kiselini koja se nalazi na terminalnom kraju galaktoze  $\alpha$ -2,6 i u manjoj meri  $\alpha$ -2,3. Postoje podaci da ovaj lektin vezuje i sijalinsku kiselinu vezanu za N-acetilgalaktozamin ili galaktozu<sup>116</sup>.

BanLec – Banana lektin, izolovan je iz plodova banana *Musa acuminata* i *Musa balbisiana*, pripada familiji jakalinu srodnih lektina. Po svojoj strukturi BanLec je homodimer koji se sastoji iz dve identične subjedinice od 15 kDa. Ovaj lektin ima visoku specifičnost vezivanja za manozu i oligosaharide bogate manozom, kao i za glukozu<sup>117</sup>.

## 2.5 Metode za detekciju patogena

Ključni izazov u stvaranju novih metoda je specifičnost i osetljivost, zatim pristupačna cena i jednostavnost izvođenja, bez obzira da li se koristi u naučne ili dijagnostičke svrhe. Potrebno je razviti metod koji za izvođenje zahteva minimalne količine uzorka i reagenasa, koji se relativno brzo izvodi, a opet, da su testovi dovoljno osetljivi i specifični.

Metode koje se koriste pri identifikaciji i karakterizaciji mikroorganizama su raznovrsne. Od klasičnih mikrobioloških analiza, koje podrazumevaju kultivaciju mikroorganizama, a samim tim i vreme, preko klasičnih antigenskih analiza, koje su najčešće bazirane na imunoafinitetu, do genetskih testova, koji se zasnivaju na detekciji naslednog materijala mikroorganizama.

Jedan od takvih pristupa je upotreba antitela koja se često koriste kao biosenzori za identifikaciju mikroorganizama usled visoke specifičnosti i jakih međusobnih interakcija. Međutim, antitela su korisna za izolaciju samo odgovarajuće vrste ili soja, što je ujedno i ograničenje ovog pristupa kada je potrebno testirati više sojeva ili vrsta mikroorganizama<sup>66</sup>. Pored ovog nedostatka, postoji i problem proizvodnje specifičnih antitela za odgovarajuće antigene, s obzirom da je proces proizvodnje izuzetno komplikovan (od imunizacije, prečišćavanja, preko eventualne proizvodnje monoklonskih antitela) i dugotrajan (minimalno vreme proizvodnje je oko 3 meseca). Čak i kada se dobiju prečišćena antitela za odgovarajuće antigene postoji mogućnost pojave unakrsne reaktivnosti, koja je rezultat niske specifičnosti.

Metode koje se zasnivaju na direktnoj detekciji patogena, poput Enzim vezujućeg imunisorbent eseja (engleski: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) i fluorescentnih

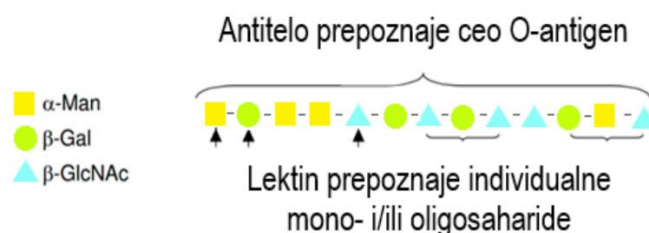
eseja<sup>118, 119</sup> bivaju najzastupljenije metode sve do uvođenja PCR metode<sup>118</sup>, za čije izvođenje je dovoljna i izuzetno mala količina patogena, za razliku od ELISA-e gde bi pri malim količinama bila nedovoljna osetljivost testa. Upotreba PCR-a povećala je mogućnost skrininga na više načina kao i samu pouzdanost testiranja, ali je takođe povećala i cenu testiranja.

Uporedo sa razvijanjem metoda baziranih na upotrebi antitela, razvijale su se i alternativne metode koje se odlikuju većom osetljivošću kao što su *wave* biosenzori<sup>120</sup>, mikrokantiliveri<sup>121</sup> i atomska mikroskopija<sup>122</sup>. Međutim sve metode na bazi biosenzora, koje koriste antitela limitirane su postojanjem specifičnih antitela, i poteškoće koje se takođe svode na razlikovanje srodnih vrsta patogena i različitih serotipova.

U poslednje dve decenije, saharidi se nameću kao alternativni bioreceptori s obzirom da se nalaze u skoro svim ćelijama kao polisaharidi, glikolipidi i glikoproteini, i drugi glikokonjugati koji su uključeni u mnogobrojne biološke procese<sup>123</sup>. Glavna prednost upotrebe saharida je što su daleko rezistentniji na denaturaciju u odnosu na proteinske antigene.

Razvoj tehnologije omogućio je razvoj prethodno usvojenih metoda detekcije glikana, pa i glikana koji se nalaze na površini mikroorganizama. Iako specifična detekcija glikanskih struktura danas ne predstavlja realnu alternativu trenutno dostupnim dijagnostičkim testovima, mogućnost praćenja površinskih glikana mikroorganizama u nativnim strukturama, pod neinvazivnim uslovima, mogla bi da pruži dodatni uvid u započinjanje i progresiju bolesti, mehanizme modulacije glikanskog omotača u toku infekcije, kao i u efikasnost određenog terapeutika u lečenju bakterijske infekcije, a samim tim mogla bi da posluži i kao baza za razvijanje inovativnih molekularnih metoda za vizuelizaciju i identifikaciju patogena.

Neke od metoda za detekciju i istraživanje glikozilacije različitih biomolekula i ćelija baziraju se na upotrebi lektina. Razlozi za odabir lektina kao molekula za analizu glikana su mnogobrojni: široki spektar komercijalno dostupnih lektina, velike varijacije u njihovoj saharidnoj specifičnosti, potencijalno visoka specifičnost i afinitet prema glikanima<sup>124</sup>. Metode se baziraju na interakciji između lektina i nativnih saharida u biomolekulima ili ćelijama, čime se istraživačima pruža šansu da zaobiđu probleme separacije i prečišćavanja biomolekula koji sadrže saharide od interesa. Iako su lektini manje specifični od monoklonskih antitela, uporednom primenom lektina različitih specifičnosti potencijalno se može nadoknaditi niža selektivnost i ovaj problem se može prevazići. Naime, visoko afinitetno monoklonsko antitelo najčešće vezuje samo jedan antigen, a suprotno tome lektini najčešće vezuju više različitih liganada (**Slika 2.7**).



**Slika 2.7. Prepoznavanje O-antigena pomoću antitela i lektina<sup>125</sup>.**

Skoro svi mikroorganizmi eksprimiraju površinske saharide koji su potencijalna mesta vezivanja lektina (**Tabela 2.2**)<sup>126</sup>.

**Tabela 2.2. Lektinski receptori na različitim mikroorganizmima<sup>125</sup>.**

Mikroorganizmi	Lektinski receptori
Gram negativne bakterije	Kapsule, citoplazmatične membrane, LPS, LOS, spoljne membrane, peptidoglikani, površinski glikoproteini
Gram pozitivne bakterije	Kapsule, specifični polisaharidi, lipotejhojna kiselina, peptidoglikani, površinski glikoproteini, tejhajna kiselina
Protozoe	Galaktomanani, glikoproteini, glikolipidi, lipofosfoglikani, fosfoglikani
Gljive	Arabini, kapsule, glukan iz ćel. zida, hitin, galaktani, manani, sekretovani proteini

Lektini imaju širok spektar liganada koji se razlikuju u zavisnosti od organizma, npr. lektinski ligandi Gram pozitivnih bakterija mogu da budu: peptidoglikani, tejhajna kiselina i lipotejhojna kiselina; kod Gram negativnih bakterija to su: lipopolisaharidi, citoplazmatska membrana, površinski glikoproteini; kod gljiva: manan, hitin i arabinani; kod protozoa: galaktomanani, glikoproteini i glikolipidi, lipofosfoglikani i fosfoglikani.

Dijagnostički principi koji su trenutno u ispitivanjima bave se upravo unikatnim saharidnim strukturama koje se nalaze na površini mnogih patogenih bakterija i ti saharidi pružaju potencijal za unapređivanje preciznosti dijagnoze bakterijske infekcije, razlikovanje ne samo između patogena i domaćina već i između različitih vrsta i sojeva bakterija<sup>127</sup>.

### 2.5.1 Analitičke metode na bazi lektina

Lektini se mogu koristiti za detekciju glikoproteina u organelama, ćelijama, pa čak i tkivima. Tokom poslednje decenije, veliki pomaci su napravljeni u lektinologiji (oblasti nauke koja se bavi lektinima); mnogi novi analitički pristupi koji se baziraju na upotrebi lektina su razvijeni ili su u razvoju, što otvara širok spektar mogućnosti za dalje, detaljnije studije svojstava saharida i njihove funkcije. Objavljeno je nekoliko studija čiji rezultati opisuju upotrebu lektina u proučavanju glikokonjugata u rastvoru i na površinama ćelija, detekciju lektin vezujućih struktura u biološkim modelima, frakcionisanje i prečišćavanje glikokonjugata, detekciju različitih patogena i dr.<sup>109, 128-131</sup>

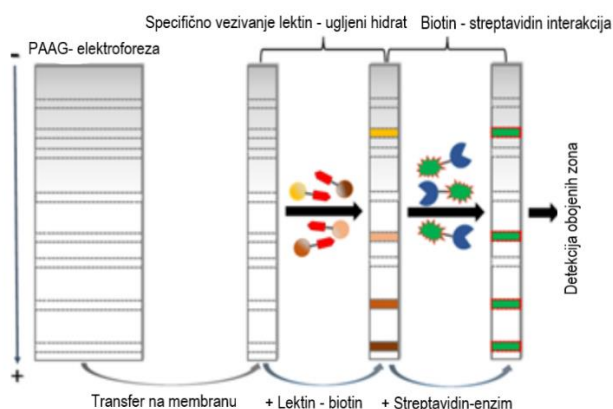
Metode koje se baziraju na interakciji lektina i ugljenih hidrata, konvencionalno mogu biti podeljene na tradicionalne i moderne. Jedna od prvih metoda upotrebe lektina je precipitaciona analiza, koja je originalno razvijena za detekciju antigen-antitelo kompleksa. Ona se bazira na inhibiciji lektinske precipitacije korišćenjem glikokonjugata mono- ili oligosaharida. Usled potreba za izuzetno velikim količinama reagenasa za analizu ona se danas ređe koristi<sup>132</sup>. U tradicionalne metode spada i semi- kvantitativna metoda inhibicije hemaglutinina, koja se zasniva na aglutinaciji eritrocita lektinima, i koja je naknadno i modernizovana upotrebom radioaktivno obeleženih lektina, što je dovelo do povećanja osetljivosti metode<sup>133, 134</sup>.

Trenutno se, detekcija i identifikacija glikana vrši najčešće upotrebom tačne hromatografije visokih performansi (HPLC) i masenom spektrometrijom<sup>135</sup>. Iako ove metode obezbeđuju pouzdano određivanje glikana, one imaju nekoliko bitnih nedostataka: izuzetno komplikovan proces pripreme uzoraka, potrebu za skupom opremom, potrebu za visoko obučanim i kvalifikovanim osobljem i izuzetno su kompleksne kada se simultano radi analiza više uzoraka kao što je to potrebno u naučnim studijama.

U poslednjih par decenija lektini se koriste kao alat u profilisanju glikana<sup>136, 137</sup>. Lektini se dosta koriste kao sorbenti, pa je i lektinska afinitetna hromatografija česta metoda za izolaciju, frakcionisanje i prečišćavanje glikana. Donnely i Goldstein 1970. su prvi razvili ovaj način afinitetne hromatografije<sup>138</sup>. S obzirom da je interakcija između lektina i ugljenih hidrata nekovalentnog karaktera i ima nizak afinitet, glikani se lako uklanjaju specifičnim kompleksom, koji je kompetitivan za to mesto vezivanja. Ova metoda naišla je na široku primenu, pa je tako npr. Sumi et al. 1999. uspeo da uz pomoć nje razlikuje karcinom prostate i benignu hiperplaziju prostate, razlikujući strukture ugljenih hidrata prostata specifičnog antigena (PSAg). Koristio je niz kolona na kojima su imobilisani različiti lektini: ConA, PSA, WGA, PhHA-E i PhHA-L4. Kvantitativnom analizom frakcija pokazao je da u slučaju karcinoma prostate, daleko viši nivo specifičnog antigena prostate u odnosu na njegove nivoe u benignoj hiperplaziji prostate, a razlog tome je kompleks sa razgranatom N-acetilglukozilamin beta(1,4) manozom<sup>139</sup>.

Alroy et al. su još pre 40 godina dokazali mogućnost bojenja histoloških uzoraka upotrebom poznatih interakcija između lektina i saharida zastupljenih na površini ćelija. Oni su osamdesetih godina prošlog veka posmatrali vezivanje biotinirovanih lektina za glikoproteine u uzorcima, korišćenjem konjugata avidin- peroksidaze i upotrebom 3,3-diaminobenzidina kao kolorimetrijskog substrata<sup>140</sup>. I danas se lektini koriste u histološkim analizama: lektini su konjugovani fluorescentno (fluorescein izotiocijanatom) i/ili enzimski (HRP), biotinom ili zlatnim nanočesticama, a njihova vizuelizacija i detekcija se vrši merenjem fluorescencije, svetlosti ili elektronskom mikroskopijom<sup>141,142</sup>. Čak je i sortiranje ćelija protočnom citometrijom moguće upotrebom fluorescentno obeleženih lektina<sup>143</sup>.

Još jedna metoda koja je razvijena na osnovu metoda koje se koriste u detekciji antigen-antitelo, je lektinski blot (Slika 2.8). Naime ona ima isti princip kao imunoblot, nakon elektroforetske separacije, proteini se prenesu strujom na nitroceluloznu membranu i inkubiraju prvo sa biotinsanim lektinima a zatim sa streptavidin enzimskim konjugatom i takav kompleks se kasnije detektuje upotrebom odgovarajućeg substrata<sup>144</sup>.



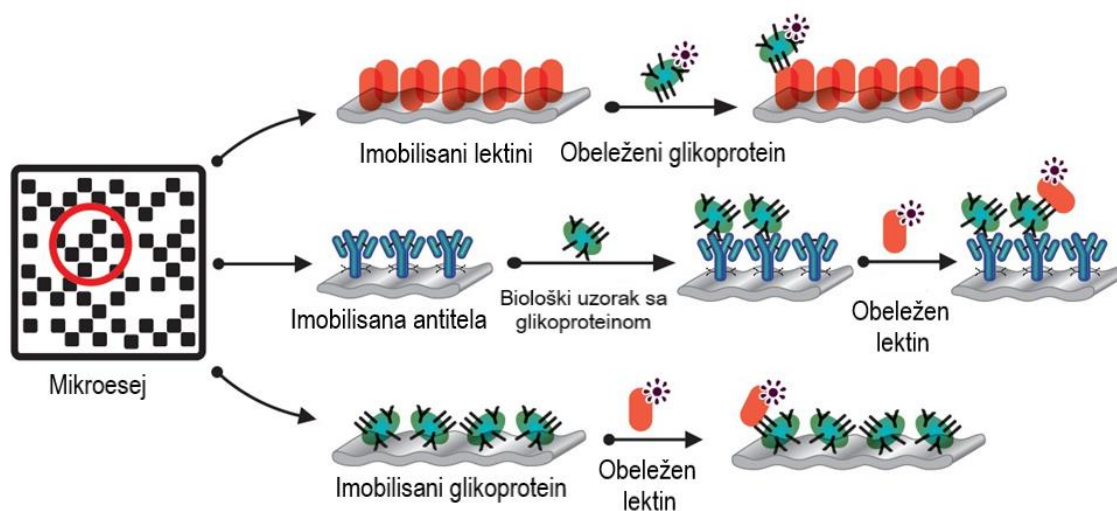
Slika 2.8. Šema lektin blotovanja<sup>143</sup>

Zajednička upotreba lektinskih histohemijskih metoda i lektinskog blota omogućava bolju karakterizaciju promena glikozilacije ćelija za vreme razvijanja primarnih tumora i

metastaza. Kombinacija masene spektrometrije i lektinskog blota može da se koristi u detektovanju tipa izmena glikoproteina.

### 2.5.2 Lektinski mikroeseji

Lektinski mikroeseji su razvijeni kao brze i senzitivne metode za analizu glikana<sup>145-154</sup>. U ovoj metodi nekoliko lektina poznate specifičnosti se imobilise na čvrstu površinu, a saharidne rezidue analiziranih uzoraka interaguju sa odgovarajućim lektinima (Slika 2.9).



Slika 2.9. Različiti tipovi lektinskih mikroeseja<sup>61</sup>

Analizom dobijenih signala vezivanja i korelacijom sa poznatim specifičnostima lektina prema određenim saharidima omogućava se brza identifikacija površinskih glikana. Vezivanje glikana za lektin omogućava brzo detektovanje njihove specifičnosti i registrovanje čak veoma slabih interakcija sa velikom preciznošću.

Do sada je predložen širok spektar upotrebe mikroeseja za detekciju glikana na različitim ćelijama<sup>155,156</sup>, bakterijama<sup>157</sup>, gljivama<sup>158</sup>, kao i u dijagnostičke svrhe<sup>159,160</sup>. Toyoda je 2011. godine pokazao da EEL, MAL i PhHA-L pružaju mogućnost istraživačima da usled razlike u vezivanju navedenih lektina razlikuju diferencirane i nediferencirane matične ćelije ljudskog embriona<sup>161</sup>. Takođe, Mahal i Hsu su pokazali da ovakva analiza glikana jasno pravi razliku između dva srodna bakterijska soja npr. *E. coli* jednog od drugog, pružajući brzo i efikasno tipiziranje bakterija, a pruža se i mogućnost praćenja dinamičke promene glikana na površini bakterija omogućavajući monitoring patogenih vrsta<sup>150</sup>. Ovo govori u prilog da lektinski eseji mogu da budu korisni ne samo za mapiranje bakterijskih površinskih glikana već i za proučavanje dinamičke uloge bakterijskih šećera kao odgovor na spoljašnje stimulse<sup>149,150</sup>. Krishnamoorthy 2009. je pomoću lektinskog mikroeseja pokazala da površinska glikozilacija humanog virusa imunodeficiencije (*eng. human immunodeficiency virus*, HIV) ima slične ugljenohidratne strukture (velike količine manoze, sijalinske kiseline, fukozilovanih epitopa, i dr.) kao i mikrovezikule, i pretpostavlja se da upravo tako virus imunodeficiencije može da se maskira u deo organizma domaćina, da "prevari" imunski sistem i napusti ćeliju domaćina<sup>162</sup>. Lektinski mikroeseji se uspešno koriste i u detekciji markera kancera, s obzirom da mnogi biološki markeri imaju glikoproteinsku strukturu.

Glikanski mikroeseji su prvi put razvijeni 2002. godine<sup>163</sup>. Glikani su imobilisani na čvrstu površinu. Glikanski mikročipovi su jedan od efikasnih načina analiziranja specifičnosti receptora influenza virusa, i upravo ovi testovi dozvoljavaju brzu analizu novih humanih virusa<sup>164</sup>. Karakteristika koja je izdvojila mikroeseje od ostalih metoda jeste mogućnost ponovnog korišćenja čipova i time niža cena izvođenja ispitivanja.

### 2.5.3 Biosenzori na bazi lektina

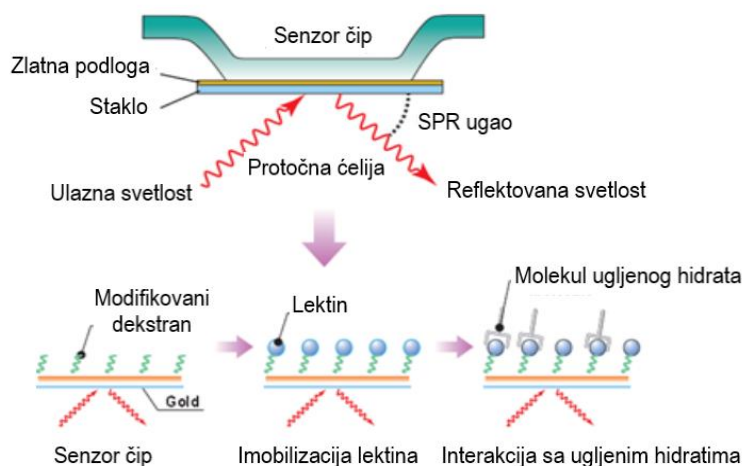
Tehnike bazirane na biosenzorima igraju bitnu ulogu u proučavanju različitih interakcija, npr. između mikroorganizama i okoline, s obzirom da su bazirane na biospecifičnim interakcijama između bioloških delova analita (mikroorganizma) i biosenzora. Biosenzori su analitički alat koji se sastoji od kombinacije bioloških receptorskih komponenti (nukleinske kiseline, lektini, enzimi, antitela itd.) i fizičko-hemijskih konduktera koji konvertuju biološki odgovor u električni, optički ili maseni signal, uglavnom u realnom vremenu (lektin-saharid, ili antitelo-antigen interakcije)<sup>165</sup>. Upravo je specifičan afinitet vezivanja saharida lektinima doveo do razvoja elektrohemijjskih i optičkih senzora.

Dominatan vid detekcije u lektinskim esejima je fluorescentna detekcija, samim tim obeležavanje uzoraka ili lektina fluorescentnim probama je neophodan korak koji prethodi analiziranju uzoraka.

Prvi korišćen lektinski fluorescentni biosenzor bio je na bazi Con A i korišćen je u cilju detektovanja saharida, ćelija kancera i patogenih bakterija<sup>166</sup>. Princip detekcije bazira se na promeni maksimalnog intenziteta fluorescencije prilikom vezivanja ConA za specifične šećere. Potencijalna mana metode je modifikacija lektinskog molekula usled vezivanja markera, što može dovesti do promene sposobnosti vezivanja za odgovarajuće šećere. Iz tog razloga razvijeni su biosenzorni sistemi koji koriste neobeležene lektine, pa je jedna od modifikacija ove metode razvijanje elektrohemijjskih biosenzora, koji se takođe zasnivaju na vezivanju lektina za ugljene hidrate<sup>167</sup>. U skladu sa napredovanjem tehnologije, napredovale su i kinetičke i afinitetne metode za analizu interakcija i detekciju biomolekula, u oblastima kao što su imunohemija, biomedicina i dijagnostika. Ovo je dovelo do razvoja inovativnih tehnologija koje ne koriste obeleživač, kao što su tehnologija automatizovane mikrovage na kristalu kvarca (QCM engleski: Quartz Crystal Microbalance), SPR (engleski: Surface Plasmon Resonance) i EIS (engleski: Electrochemical Impedance Spectroscopy), a uspešne su u detektovanju i profilisanju glikana<sup>168</sup>.

Upotreba QCM bazira se na promeni rezonantne frekvence kvarcnog kristala kao rezultat akumulacije mase usled interakcije koja se dešava između lektina i ugljenih hidrata<sup>169</sup>. U poređenju sa QCM, SRP ima mnoge prednosti: dozvoljava praćenje biomolekularnih interakcija u realnom vremenu, može da odredi kinetičke parametre, konstante asocijacije, konstante disocijacije, kao i konstantu afiniteta, što je posebno korisno pri analizi biološke specifičnosti i funkcije<sup>170</sup> (Slika 2.10). Zhang et al. 2010. godine razvili su biosenzore bazirane na SNA i ConA kako bi uporedili ekspresiju sijalinske kiseline i manoze u normalnim ćelijama i ćelijama kancera pluća, jetre i prostate. Rezultati su pokazali da je nivo ekspresije manoze kod normalnih i ćelija kancera isti, dok je nivo sijalinske kiseline drastično povećan kod ćelija kancera. Biosenzori koji su zasnovani na SNA nisu samo kvantitativno detektovali ćelije kancera već su procenili i zastupljenost sijalinske kiseline na površini ćelija, što je veoma bitno kako bi se pratila progresija kancera<sup>171</sup>. Međutim, tehnologija lektinskih biosenzora je ograničena na laboratorijsku upotrebu i u ovom trenutku nije komercijalizovana, prvenstveno usled izuzetne kompleksnosti metode. Kada se uporedi sa lektinskim mikroesejima, biosenzori bez obeleživača imaju veću senzitivnost, i mogu da se izvode i kvantitativne analize. Međutim

analiziranje većeg broja uzoraka je moguće i kod lektinskih mikroeseja i upravo zato se lektinski mikroeseji koriste za karakterizaciju sastava ugljenih hidrata nepoznatih glikoproteina, dok se biosenzori koriste za merenja afiniteta<sup>61</sup>.

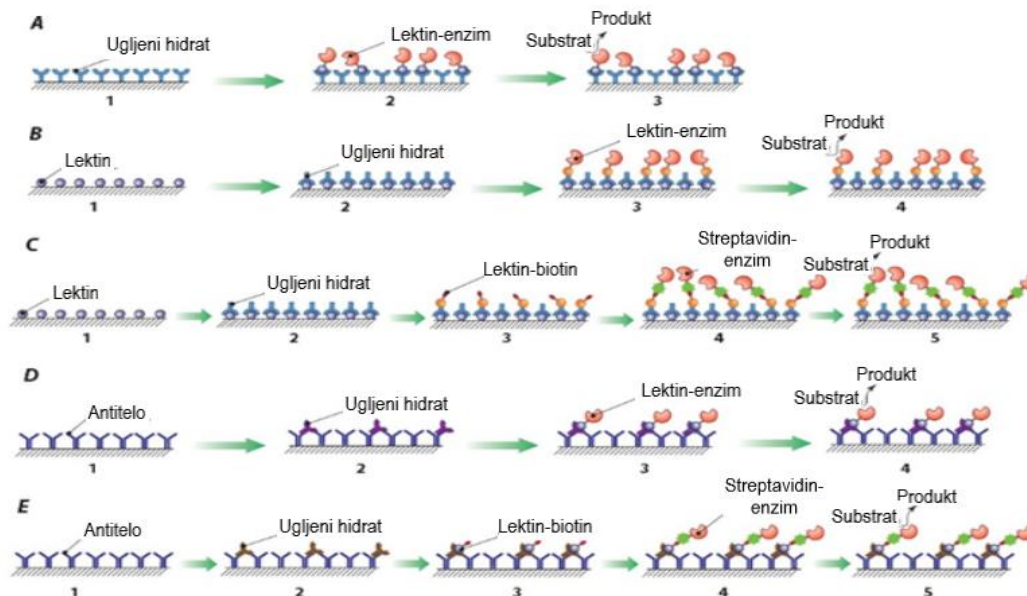


**Slika 2.10. Detekcija interakcije lektin-ugljeni hidrat pomoću SPR biosenzora<sup>61</sup>**

#### 2.5.4 ELLSA

Skraćenica ELLSA formirana je za potrebe eksperimentalnog rada u okviru ove teze i ima za cilj da predoči sličnost eseja sa ELISA-om. ELLSA je adaptacija enzim vezanog imunosorbent eseja (ELISA), i predstavlja mogućnost analize ćelija i struktura saharida na ćelijskim membranama, zidovima i kapsidima. ELISA je zasnovana na vezivanju antigena za specifična antitela, koja su biotinirovana ili direktno vezana za enzim. Međutim, kada se radi karakterizacija saharida neophodno je upotrebiti antitela različitih specifičnosti. Zbog toga su Goodarzi i Turner 1997. predložili alternativni način upotrebe lektina obeleženih digoksigeninom (DIG) i detekcija se vršila DIG-specifičnim antitelima<sup>172</sup>.

ELLSA sa “biotin-avidin” sistemom je predložena radi proučavanja specifičnosti bakterijskih lektina u studijama Singh 2006. i Wu 2003.<sup>173,174</sup>. Ona se bazira na upotrebi biotin-avidin interakcije, koja se karakteriše visokim afinitetom. Biotinilovani lektini se ponašaju kao obrasci molekularnog prepoznavanja prema specifičnim glikoproteinima i drugim visoko molekulskim glikokonjugatima, koji su nekovalentno adsorbovani na zid mikrotitarske ploče. U sledećem koraku se detekcija formiranog kompleksa, vrši upotrebom (strept)avidin-enzim konjugata<sup>175</sup>. Hendrickson je 2017. godine sproveo ELLSA-u u *sendvič* formatu kako bi detektovao *E.coli* i *S. aureus* bakterijske ćelije, upotrebom nekoliko biljnih lektina poznate specifičnosti<sup>176</sup> (Slika 2.11).



**Slika 2.11. Različiti formati ELLSA:** A) format sa imobilizovanim ugljenim hidratima; B) "sendvič" format sa imobilizovanim lektinom i lektin-enzimskim konjugatom; C) "sendvič" format sa imobilizovanim lektinom, lektin-biotinom i streptavidin-enzimskim konjugatom; D) "sendvič" format sa imobilizovanim antitelima na ugljene hidrate i konjugatom elektron-enzim; E) „sendvič“ format sa imobilizovanim antitelima na ugljene hidrate, lektin-biotinom i konjugatom enzima streptavidina<sup>61</sup>.

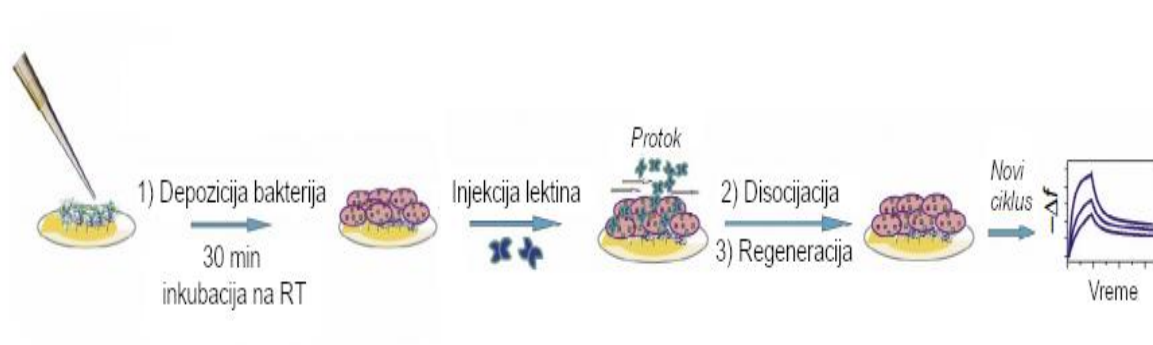
### 2.5.5 QCM tehnologija

Nakon Sauerbrejevog otkrića 1959. godine da frekvencija rezonancije kvarcnih kristala linearno opada sa dodavanjem mase na njihovu površinu, metode koje se baziraju na korišćenju kvarcnih kristala nalaze svoju primenu kao izuzetno korisno analitičko sredstvo<sup>177</sup>. Njihova sposobnost promene frekvencije konvertuje se upotrebom odgovarajućeg provodnika u električni signal koji je proporcionalan količini vezanog analita. Upravo na ovome se zasniva princip korišćenja QCM tehnologije kojim se meri jačina molekularnih interakcija. QCM biosenzori se koriste za analiziranje interakcije biomolekula bez upotrebe obeleživača, u realnom vremenu, omogućavajući procenu afiniteta vezivanja i kompletnu kinetiku interakcija (Slika 2.12).

Glavna prednost ovakvog pristupa je upotreba kompletne bakterijske ćelije, što dovodi do mogućnosti ispitivanja interakcija površinskih bakterijskih glikanskih epitopa i lektina u njihovom prirodnom okruženju.

Postavka eksperimenata za merenje interakcija lektina sa šećernim komponentama mikroorganizama korišćenjem QCM tehnologije može biti različita:

- 1) direktno nanošenje prečišćenih biomolekula na kvarcnu pločicu (čip),
- 2) nanošenje živih ćelija i njihovo gajenje na čipu,
- 3) nanošenje ćelijske suspenzija na čip koji je prethodno obogaćen lektinima sa odgovarajućim afinitetom<sup>178</sup>.



**Slika 2.12. Analiziranje kinetike interakcija lektina i mikroorganizama QCM tehnologijom<sup>178</sup>**

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Kako interakcije između mikroorganizama i domaćina imaju ključnu ulogu u infekciji i progresiji infektivnih bolesti, a figurišu i tokom homeostaze, postoji opravdana potreba da se identifikuju i okarakterišu komponente koje učestvuju u toj interakciji. Procesom glikozilacije na površini svih mikroorganizama formira se jedinstvena arhitektura površinskih polisaharidnih struktura i upravo ovaj proces smatra se ključnim faktorom virulencije mnogih mikroorganizama.

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je da se, kroz ispitivanje interakcija biljnih lektina sa polisaharidnim strukturama na površini različitih mikroorganizama, profilišu površinske saharidne strukture mikroorganizama, utvrde specifične interakcije, definiše i validira ELLSA metoda, kao metoda za brzu identifikaciju interakcija između lektina i mikroorganizama.

Kako bi se ostvario ovaj cilj planirano je da se eksperimentalni deo disertacije realizuje kroz 7 faza, čiji su pojedinačni ciljevi:

#### 1) Uspostavljanje ELLSA metode sa imobilisanim mikroorganizmima

U prvom delu ekperimentalnog rada planirano je definisanje uslova ELLSA metode sa imobilisanim mikroorganizmima, u cilju uspostavljanja odgovarajućeg *in vitro* testa za karakterizaciju specifičnog vezivanja biljnih lektina za polisaharide na površini mikroorganizama.

#### 2) Validacija ELLSA metode

Prilikom validacije ELLSA metode planirano je da se odredi specifičnost vezivanja lektina za mikroorganizme u cilju određivanja površinske glikozilacije mikroorganizama. Inhibicija vezivanja lektina vršice se pomoću različitih monosaharida. U sklopu ovih eksperimenata cilj je bio i da se ispituju opseg linearnosti, tačnost i preciznost metode, u okvirima u kojima ekserimentalna postavka to omogućava.

#### 3) Tipizacija površinski dostupnih polisaharidnih struktura

U okviru faze tipizacije dostupnih polisaharidnih struktura planirano je da se korišćenjem različitih biljnih lektina poznate specifičnosti utvrde dostupne polisaharidne strukture na površini mikroorganizama korićenih u eksperimentalnom radu.

#### 4) Ispitivanje interakcija površinskih polisaharida mikroorganizama i lektina obeleženih fluoresceinom pomoću protočne citometrije

U okviru faze ispitivanja interakcija površinskih polisaharida mikroorganizama sa lektinima planirano je obeležavanje biljnih lektina fluorescein 5(6)-izotiocijanatom (FITC), praćenje interakcija fluoresceinom obeleženih lektina sa mikroorganizama metodom protočne citometrije.

5) Poređenje ELLSA metode i protočne citometrije

U okviru ove faze planirana je korelaciona analiza dobijenih podataka i poređenje rezultata ELLSA metode i protočne citometrije, radi dobijanja potvrde specifičnih interakcija ili definisanja ograničenja jedne metode u odnosu na drugu.

6) Ispitivanje jačine interakcije lektina sa bakterijskim polisaharidima pomoću QCM tehnologije

Planirano je ispitivanje afiniteta izabranih lektina prema glikanskim strukturama na površini bakterija od interesa. U ovu svrhu korišćena je QCM tehnologija i senzor čipovi kuplovani biljnim lektinima.

7) Ispitivanje praktične primene uspostavljenih metoda

U svrhu ispitivanja mogućnosti praktične primene uspostavljene metodologije vršice se međusobno poređenje vezivanja lektina za različite mikroorganizme, kao i poređenje vezivanja lektina sa vezivanjem serumskih antitela za mikroorganizme.

## 4. NAŠI RADOVI

U istraživanjima koja su realizovana u sklopu izrade ove doktorske disertacije korišćena su 34 mikroorganizama i 8 različitih lektina biljnog porekla, pomoću kojih je izvršeno profilisanje površinskih polisaharidnih struktura mikroorganizama, upotrebom novouspostavljene metode - ELLSA, koja je vrlo slična klasičnoj ELISA-i. Sedam od osam lektina su komercijalno nabavljeni od Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) i to: *Maackia amurensis* aglutinin (MAA), Soybean aglutinin (SBA), *Lens culinaris* aglutinin (LCA), Wheat germ aglutinin (WGA), *Ricinus communis* aglutinin (RCA<sub>120</sub>), *Canavalia ensiformis* lektin (Con A) i *Sambucus nigra* aglutinin (SNA I); dok je rekombinantni BanLec (*Musa acuminata*) prečišćen iz ćelija *E. coli*, dobijen od prof. Gavrović-Jankulović, sa Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu<sup>179</sup>.

Navedeni lektini su selektovani na osnovu razlika u afinitetu vezivanja za saharide koji se eksprimiraju u okviru procesa glikozilacije na površini ispitivanih mikroorganizama.

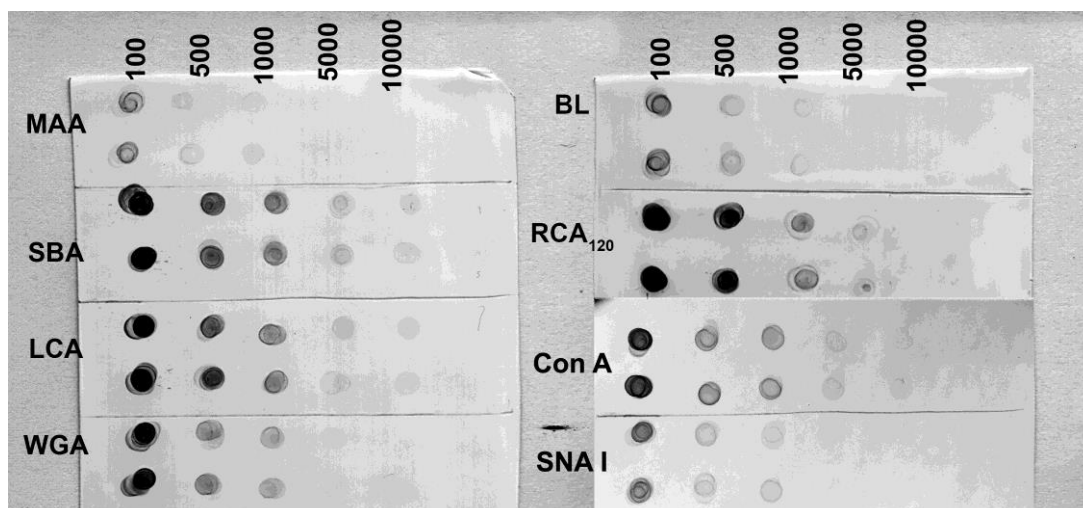
### 4.1 Efikasnost biotiniovanja i analiza čistoće lektina

Prvi korak u ispitivanju vezivanja lektina za površinske strukture mikroorganizama, bio je biotiniovanje biljnih lektina da bi se signal mogao meriti pomoću spektrofotometra.

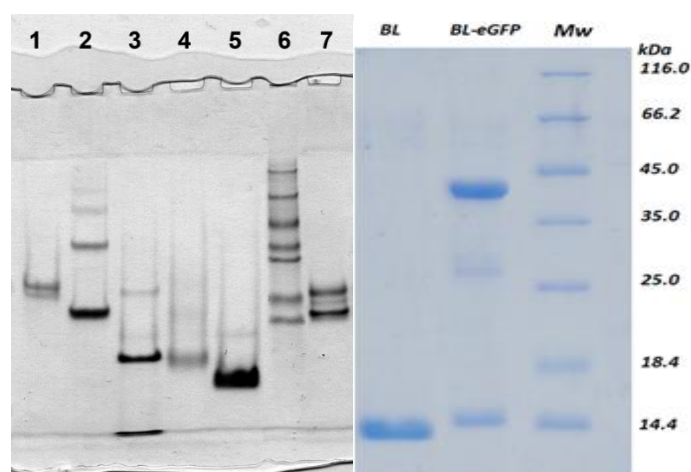
Lektini su biotiniovani (+)-Biotin N-sukcinimidil estrom koji je prethodno rastvoren u anhidrovanom dimetil-sulfoksidu (DMSO). Koncentracija proteina svih biotiniovani lektina je bila u opsegu od 1-3 mg mL<sup>-1</sup>. Efikasnost biotiniovanja lektina je analizirana je pomoću Dot blot metode, ukapavanjem analita na nitroceluloznu membranu. Serijskim razblaživanjem biotiniovanih lektina u Dot blotu i vezivanjem streptavidin-alkalne fosfataze pokazano je da efekat biotiniovanja nije bio jednak za sve lektine, kao što je prikazano, **Slika 4.1**.

Biotiniovanje lektina MAA je bila najmanje uspešna i zahtevala je manja razblaženja u daljim analizama.

Nakon potvrde biotiniovanja lektina, za analizu čistoće biotiniovanih lektina na osnovu molekulske mase, urađena je SDS-elektroforeza na 8% poliakrilamidnom gelu u redukujućim uslovima. Čistoća većine biotiniovanih lektina i očuvanost njihove strukture prikazana je na **Slici 4.2**.



**Slika 4.1. Testiranje efikasnosti biotilovanja lektina Dot blot metodom.** Razlaženja lektina navedena su u gornjem delu slike, a skraćenice naziva lektina sa leve strane. Vizuelizacija je urađena upotrebom streptavidin alkalne fosfataze/NBT/BCiP. MAA - *Maackia amurensis* aglutinin; SBA - *Soybean* aglutinin; LCA - *Lens culinaris* aglutinin; WGA - *Wheat germ* aglutinin; BL - *Musa acuminata* (banana) rekombinantni lektin; RCA120 - *Ricinus communis* aglutinin Con A - *Canavalia ensiformis* lektin; SNA I – *Sambucus nigra* aglutinin.



**Slika 4.2. Poliakrilamidni gel, 8%, obojen pomoću Coomassie brilliant blue CBB R250:** A) Uzorci u redukujućim uslovima; redosled: 1) MAA - *Maackia amurensis* aglutinin; 2) SBA - *Soybean* aglutinin; 3) LCA - *Lens culinaris* aglutinin; 4) WGA - *Wheat germ* aglutinin; 5) BL - *Musa acuminata* (banana) rekombinantni lektin; 6) Marker (Sigma Prestained SDS-PAE Molecular Weight Marker SDS7B: 26.6, 36.5, 48.5, 58, 84, 116, 180 kDa); 7) RCA120 - *Ricinus communis* agglutinin. B) Uzorci u redukujućim uslovima; redosled: BL – prečišćen BanLec; BL-eGFP – himerni fluorescentno zeleno obeležen BanLec; Proteinski marker.

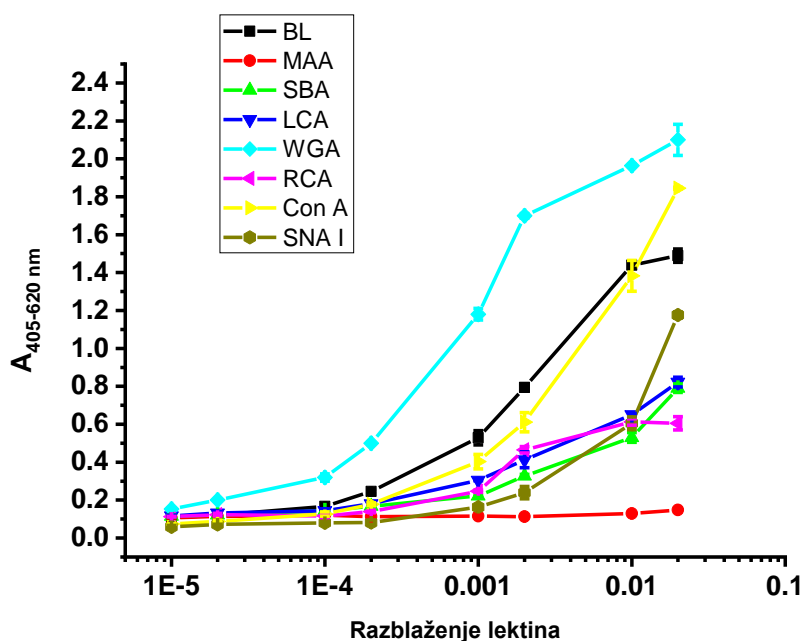
## 4.2 Optimizacija ELLSA sa celim mikroorganizmima

ELLSA, korišćena u ovoj studiji se zasniva na vezivanju mikroorganizama za MaxiSorp mikrotitar ploču, i detekciju prisustva glikanskih struktura pomoću biotinirovanih lektina i streptavidina obeleženog enzimom.

Prvi korak, za optimizaciju ELLSA metode bio je određivanje optimalne koncentracije lektina i detektovanje signala vezivanja lektina za mikroorganizme koji na svojoj površini sadrže poznate glikane. Optimalna količina mikroorganizama koje je potrebno naneti na mikrotitarsku ploču određena je ranije u eksperimentima sličnog tipa<sup>180</sup>.

### 4.2.1 Određivanje optimalne koncentracije lektina u ELLSA

Prva istraživanja su bila usmerena ka određivanju optimalne koncentracije lektina koje bi se koristile u testiranju. Da bi stekli uvid u razblaženja koja je potrebno koristiti, napravljen je tzv. "pool" mikroorganizama, tj. mikroorganizmi navedeni u **Tabeli 6.3** su pomešani u jednakom odnosu i tako nanešeni na mikrotitar ploču. Urađena je titracija vezivanja različitih lektina za ovaj "pool" mikroorganizama. Tada je zabeležena veća reaktivnost BanLec, ConA i WGA u odnosu na ostale lektine koji su korišćeni u testu (**Slika 4.3**).



**Slika 4.3.** Titracija vezivanja lektina za mix od različitih mikroorganizama (21) zakačenih na ploču. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.

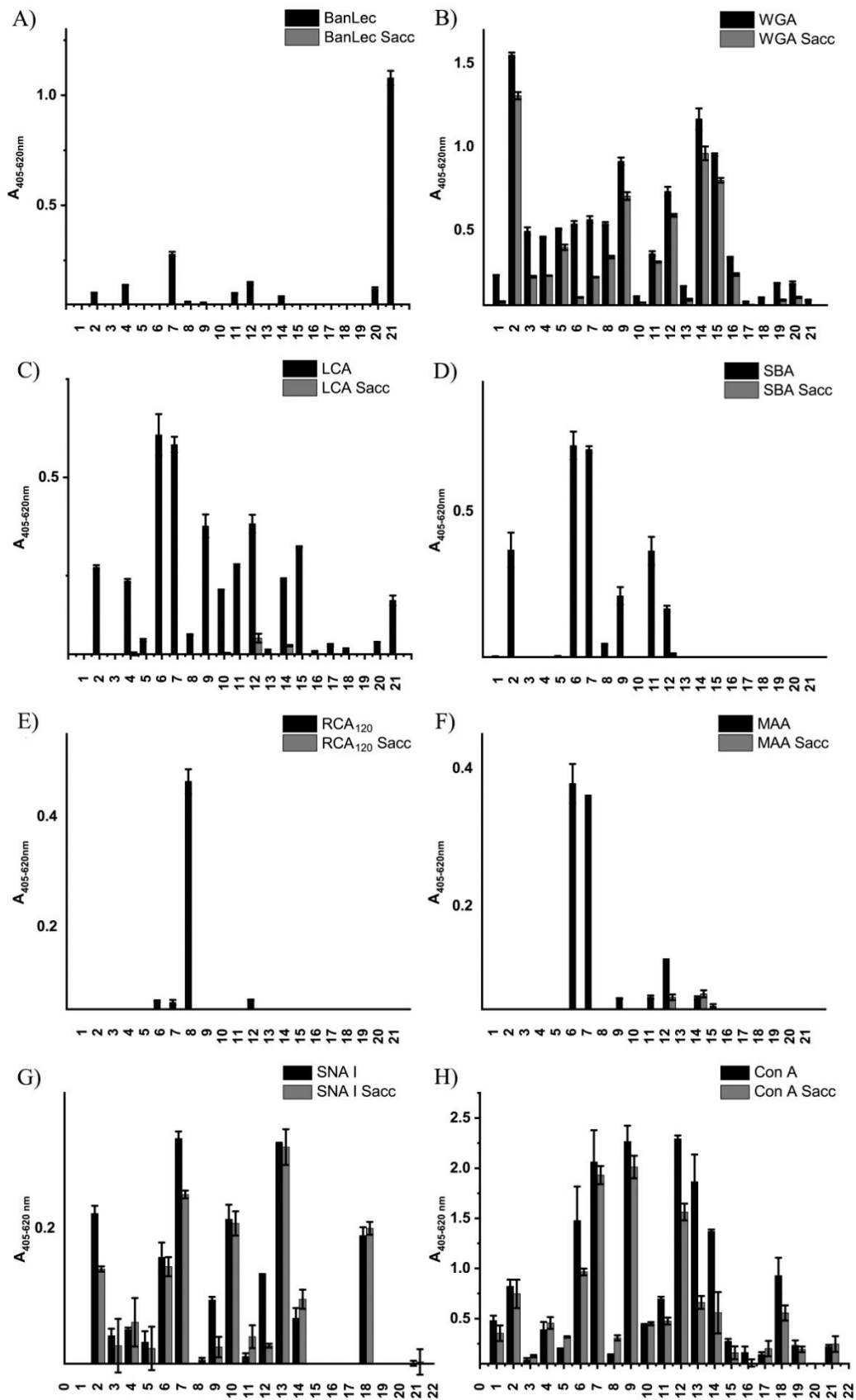
Vezivanje MAA naizgled nije bilo moguće testirati na ovaj način, međutim pošto je u ovom pilot eksperimentu postojala dominacija većih mikroorganizama, konkretno gljiva, MAA je korišćen, samo u većim koncentracijama. Koncentracije lektina korišćene u daljim analizama su bile sledeće: BanLec  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , MAA  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ , LCA  $1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , WGA  $1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , SBA  $1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , RCA120  $2,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Con A  $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , SNA I  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Koncentracija lektina je određena Lowry-jevom metodom, koja se pokazala najadekvatnija u ovom slučaju.

#### 4.2.2 Analiza vezivanja lektina i mikroorganizama

ELLSA-om je ispitana sposobnost vezivanja selektovanih lektina za odabrane mikroorganizme. Polazna pretpostavka bila je da će u slučaju detektovanja specifičnih interakcija lektina, poznatih afiniteta, sa površinskim polisaharidnim strukturama ispitivanih mikroorganizama, koji su direktno adsorbovani na ELISA poloču, doći do pojave signala, čija jačina će zavisi od afiniteta lektina i zastupljenosti glikana prema kojima lektin pokazuje afinitet, kao što je u ovoj studiji pokazano za vezivanje BanLec-a za gljive. Sa druge strane, dodavanje monosaharida u rastvor lektina može dovesti do inhibicije vezivanja lektina za površinske polisaharidne strukture mikroorganizama kod kojih je već registrovan signal.

Vezivanje pojedinačnih lektina (sa i bez monosaharida) za individualne mikroorganizme je prikazano na **Slici 4.4; A-H**. Dobijene vrednosti ispitivanja potvrđene su u tri nezavisna eksperimenta.

Lektini WGA i ConA pokazali su afinitet vezivanja za većinu testiranih mikroorganizama (**Slika 4.4B i H**) i samim tim oba navedena lektina su se pokazala kao najmanje specifični lektini i/ili lektini koji se vezuju za glikanske strukture koje su zajedničke većini testiranih mikroorganizama. SNA I, LCA i SBA pokazali su relativno nisku selektivnost (**Slika 4.4C, D i G**), dok su ostali lektini, BanLec, RCA<sub>120</sub> i MAA pokazali visok nivo selektivnosti, detektujući saharidne strukture prisutne samo na određenim mikroorganizmima. Od testiranih mikroorganizama BanLec se selektivno vezivao za *C. albicans* ATCC 10259 (**Slika 4.4A**), RCA<sub>120</sub> se vezivao za *L. casei* DG (**Slika 4.4E**) i MAA za *L. helveticus* LAFTI i *L. acidophilus* ViVag (**Slika 4.4F**).



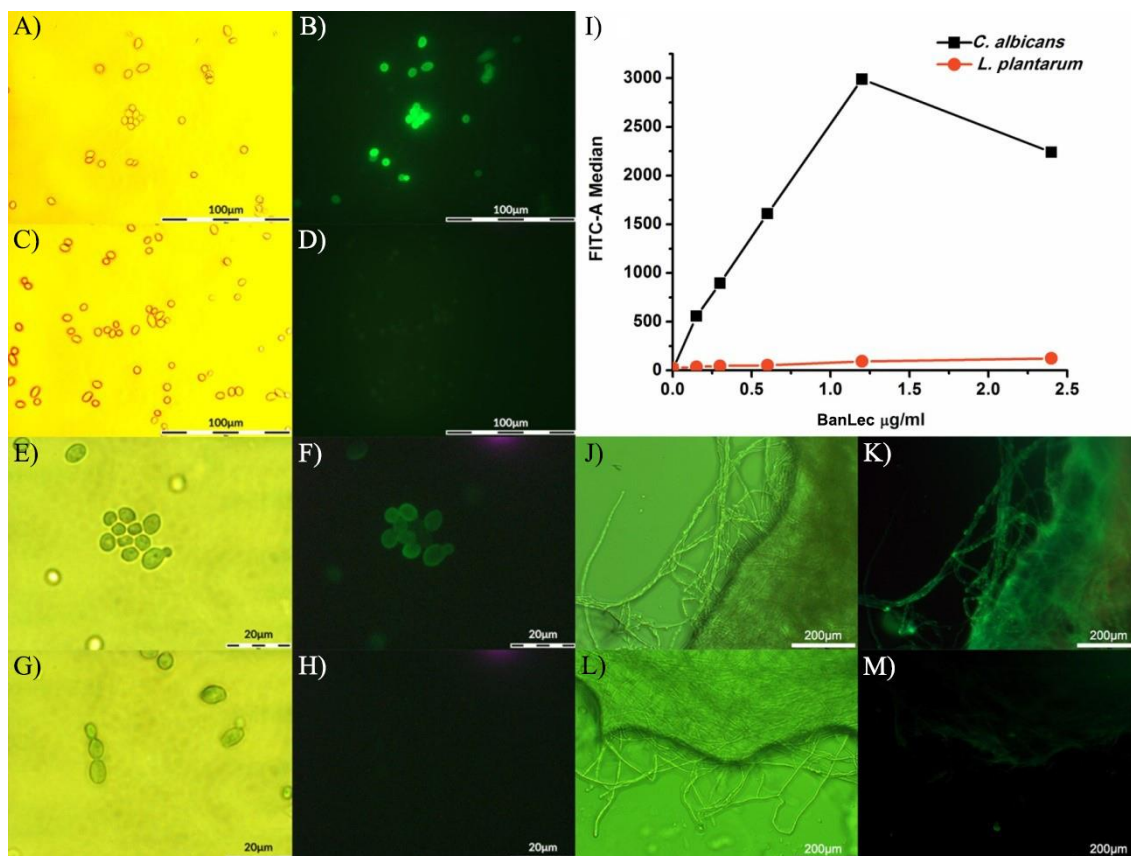
Slika 4.4. Detekcija vezivanja biotinilovanih lektina za mikroorganizme ELLSA metodom i inhibicija mešavinom monosaharida: A) vezivanje BanLec-a za mikroorganizme; B) vezivanje WGA

za mikroorganizme; C) vezivanje LCA za mikroorganizme; D) vezivanje SBA mikroorganizme; E) vezivanje RCA<sub>120</sub> za mikroorganizme, F) vezivanje MAA za mikroorganizme, G) vezivanje SNA I za mikroorganizme; H) vezivanje ConA za mikroorganizme. Sacc – 0.5 M mešavina monosaharida (glukoze, manoze, galaktoze). Brojevi označavaju sledeće mikroorganizme: 1. *L. reuteri* DSM 17938, 2. *L. plantarum* WCFS1, 3. *L. rhamnosus* LA68, 4. *L. rhamnosus* LB64, 5. *L. rhamnosus* LGG, 6. *L. helveticus* LAFTI L10, 7. *L. acidophilus* ViVag, 8. *Lactobacillus casei* DG, 9. *S. pyogenes* ATCC 19615; 10. *S. agalactiae* ATCC 13813; 11. *Streptococcus* sp. CI  $\beta$ -hemolytic group B; 12. *Streptococcus* sp. CI  $\beta$ -hemolytic group A; 13. *E. faecalis* CI; 14. *S. aureus* CI; 15. *P. mirabilis* CI; 16. *E. coli* CI; 17. *K. pneumoniae* ATCC 13883; 18. *P. aeruginosa* ATCC 27853; 19. *P. hauseri* ATCC 13315; 20. *S. flexneri* ATCC 12022; 21. *C. albicans* ATCC 10259. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.

Ključni strukturni polisaharid unutrašnjeg ćelijskog zida *C. albicans* je  $\beta$ -(1,3)-glukan<sup>181</sup>, a spoljni ćelijski zid *C. albicans* prekriven je veoma manozilovanim proteinima koji su umreženi sa  $\beta$ -(1,6)-glukanom. Smatra se da upravo ovaj spoljni manozilovani sloj odgovoran za skrivanje  $\beta$ -glukana od ćelija imunog sistema domaćina i to konkretno od Dektina I<sup>182,183</sup>. Sa druge strane, postoje mnogi endogeni lektini, kao na primer: DC-SIGN (engleski: Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion molecule 3-Grabbing Nonintegrin), poznat i kao CD209 i manozni receptor makrofaga (CD206)<sup>184</sup> koji prepoznaju upravo manozne površinske residue *Candida*.

#### 4.2.3 Vizuelizacija vezivanja lektina

Daljim istraživanjem odlučili smo da potvrdimo rezultate vezivanja lektina za mikroorganizme dobijene pomoću ELLSA, direktnom vizuelizacijom tih interakcija. Naime, visoko specifično vezivanje BanLec-a za *C. albicans* potvrdili smo sa dve nezavisne metode, fluorescentnom mikroskopijom (**Slika 4.5B i F**) i protočnom citometrijom, gde se plato dostiže sa koncentracijama koje su iznad 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (**Slika 4.5I**). Visoko specifično vezivanje BanLec-a za kvasce, potvrdili smo detektujući fluorescentnim mikroskopom interakciju *A. brasiliensis* upravo sa ovim lektinom (**Slika 4.5J-M**).



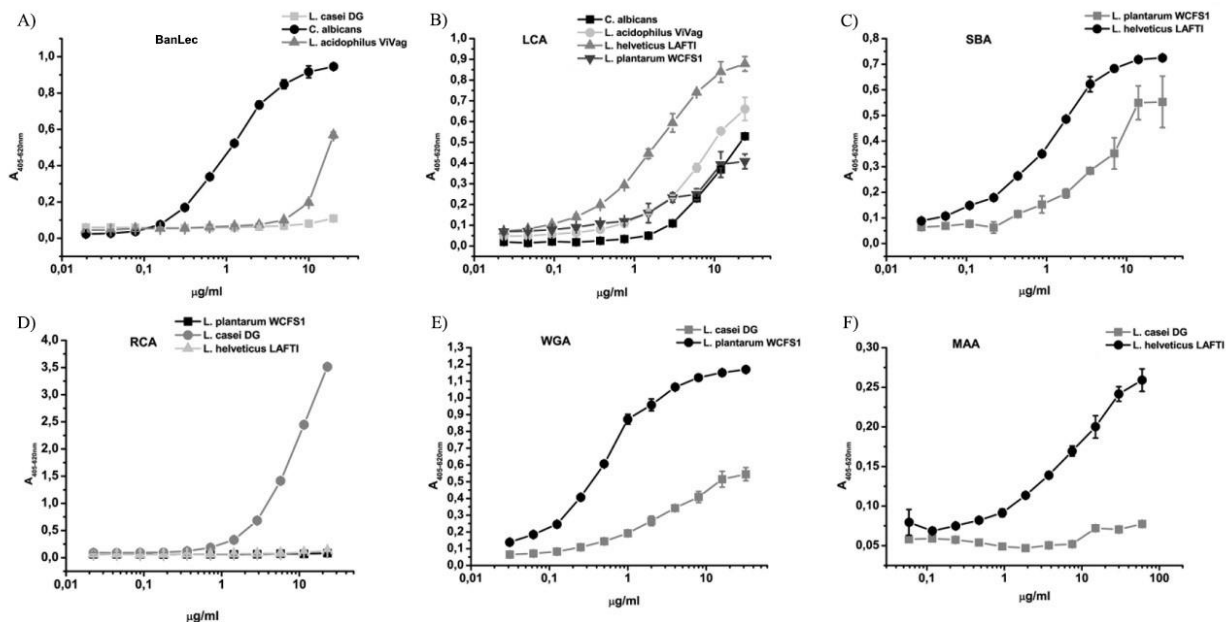
**Slika 4.5. Detektovanje vezivanja BanLec za *C. albicans* ATCC 10259 i *A. brasiliensis* ATCC 16404, upotrebom fluorescentnog mikroskopa.** A), E), svetlosno polje i B), F) – fluorescentno polje *C. albicans* obojena sa biotiniловanim BanLec i vizuelizovana pomoću streptavidin-FITC, C), G) – svetlo i D), H) – fluorescentna slika *C. albicans* bojenje pomoću streptavidin -FITC (kontrola). A), B), C), D) – 10 x uveličanje; E), F), G), H) – 40 x uveličanje. I) protočna citometrija; detekcija vezivanja BanLec za *C. albicans*. Negativna kontrola vezivanja bio je *L. plantarum* WCFS1. J), K) – svetlosna i fluorescentna slika *A. brasiliensis* obojenog sa biotiniловanim BanLec-om bez dodate glukoze i L), M) – svetlosna i fluorescentna slika sa dodatom glukozom; 10 x uveličanje.

#### 4.2.4 Titracija vezivanja lektina za mikroorganizme

Rezultati dobijeni korišćenjem ELLSA bili su u skladu sa podacima dostupnim u literaturi, što je potvrđeno i pomoću protočne citometrije i direktne vizuelizacije, te je zaključeno da ELLSA ima potencijal u ispitivanju interakcija između lektina i mikroorganizama. S obzirom na dobijene rezultate, pristupili smo titracionim eksperimentima kako bi potvrdili specifičnost dobijenih interakcija i videli zavisnost intenziteta signala od količine dodatog lektina.

Titracione krive dobijene ELLSA metodom (Slika 4.6), pokazuju da se saturacija može postići kada se BanLec vezuje za *C. albicans* (Slika 4.6A); kada se LCA i SBA vezuju za *L. helveticus* LAFTI (Slika 4.6B i C) i kada se WGA vezuje za *L. plantarum* WCFS1 (Slika 4.6E). Takođe, pokazano je da postoji varijacija krajnje tačke titracije koja je zavisna od lektinskog molekula koji je korišćen, sa opsegom od  $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$  za BanLec u interakciji sa *C. albicans*;  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  za LCA u interakciji sa *L. helveticus* LAFTI;  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  za SBA u interakciji sa *L. helveticus* LAFTI;  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  za RCA<sub>120</sub> u interakciji sa *L. casei* DG;  $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$  za RCA<sub>120</sub> u interakciji sa *L. casei* DG.

$\text{mL}^{-1}$  za WGA u interakciji sa *L. plantarum* WCFS1 i  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  za MAA u interakciji sa *L. helveticus* LAFTI.

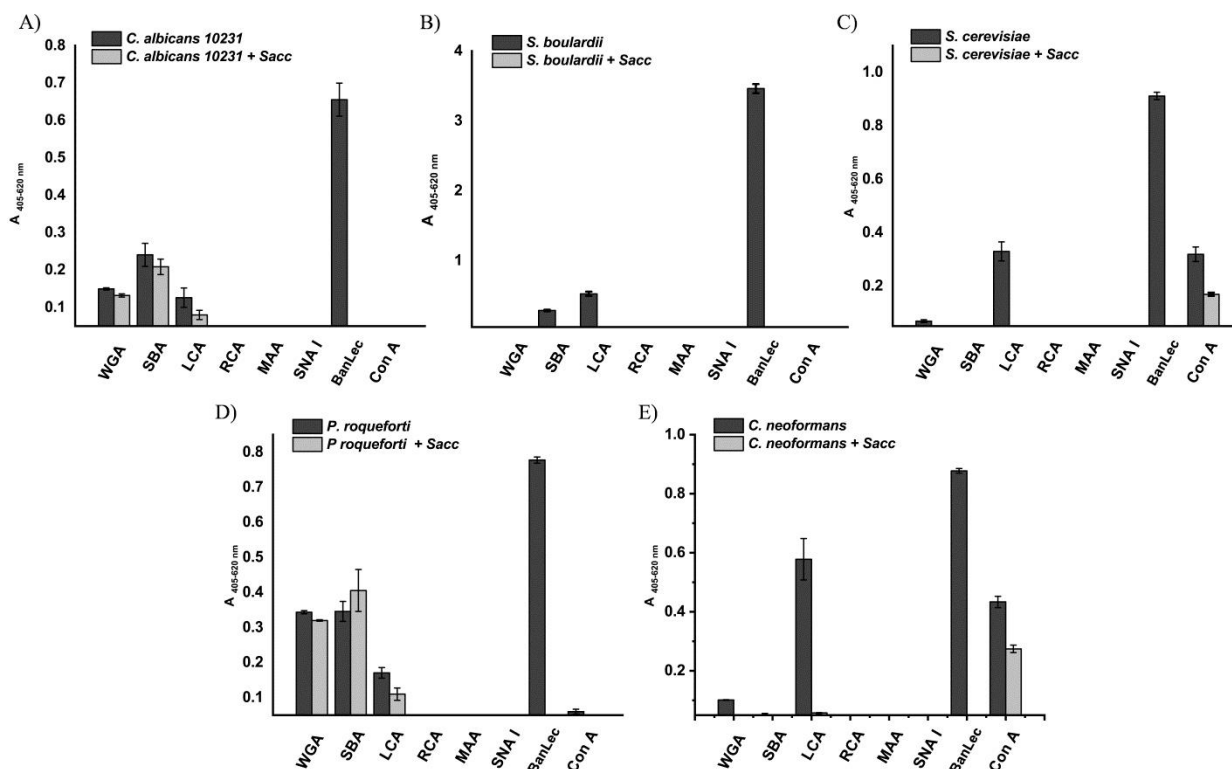


**Slika 4.6.** Titracija lektinske reaktivnosti sa mikroorganizmima, pomoću ELLSA: A) *BanLec*; B) *LCA*; C) *SBA*; D) *RCA*<sub>120</sub>; E) *WGA*; F) *MAA*. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.

#### 4.2.5 Ispitivanje vezivanja *BanLec*-a za $\beta$ -D-glukan

Prethodnim eksperimentima, pokazali smo da *BanLec* pokazuje jedinstveni afinitet prema *C. albicans*. Poreklo tih interakcija može poticati ili od interakcije sa manoznim strukturama koje se nalaze na površini gljiva, ili pak može biti specifično za gljive usled interakcije sa fungalnim  $\beta$ -D-glukanom. Kako bi ispitali vezivanje *BanLec*-a za fungalni  $\beta$ -D-glukan, povećali smo broj vrsta gljiva na kojima je testiran afinitet vezivanja ovog lektina.

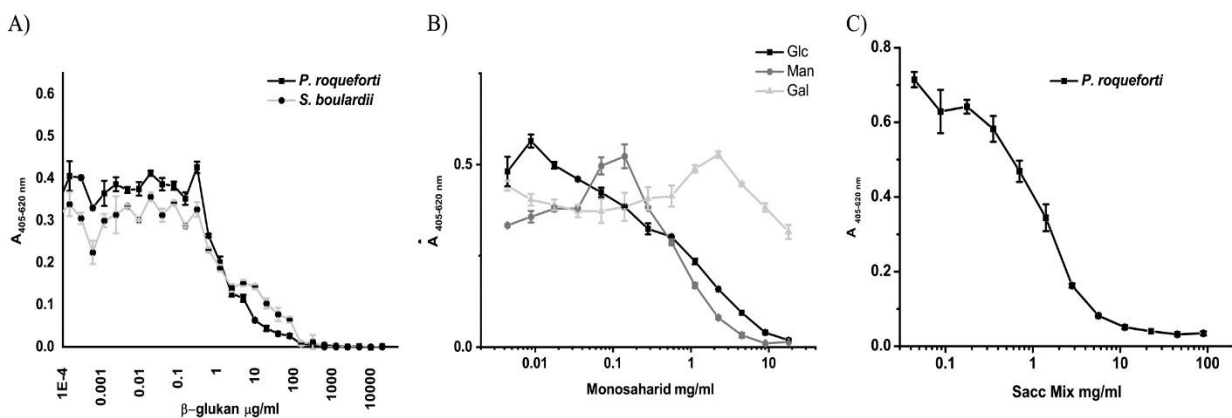
U ovom koraku ispitivali smo afinitet vezivanja svih osam lektina za pet vrsta gljiva: *C. albicans*, *S. boulardii*, *S. cerevisiae*, *P. roqueforti* i *C. neoformans*, (Slika 4.7.). *BanLec* je pokazao afinitet vezivanja prema svim testiranim gljivama. Signal vezivanja *BanLec*-a za sve vrste gljiva bio je znatno jači u odnosu na sve ostale signale koji su registrovani pri interakcijama drugih lektina sa gljivama. Interesantno je da se *ConA* nije vezivao za sve testirane gljive, na šta nije imao uticaja dodatak kalcijuma.



**Slika 4.7. Detekcija vezivanja osam biljnih lektina za gljive ELLSA metodom.** Sacc – 0,5 M mešavina monosaharida (glukoze, manoze, galaktoze). Korišćene gljive su: A) *C. albicans*; B) *S. boulardii*; C) *S. cerevisiae*; D) *P. roqueforti*; E) *C. neoformans*. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.

#### 4.2.6 Inhibicija vezivanja BanLec-a za $\beta$ -D-glukan

Nakon, detekcije signala pri interakciji BanLec-a sa gljivama, ispitivana je sposobnost inhibicije interakcije lektin – gljiva, dodavanjem: 1)  $\beta$ -glukana iz *S. cerevisiae* (Slika 4.8A), 2) pojedinačnih monosaharida (Slika 4.8B) i 3) mešavine monosaharida (Slika 4.8C).



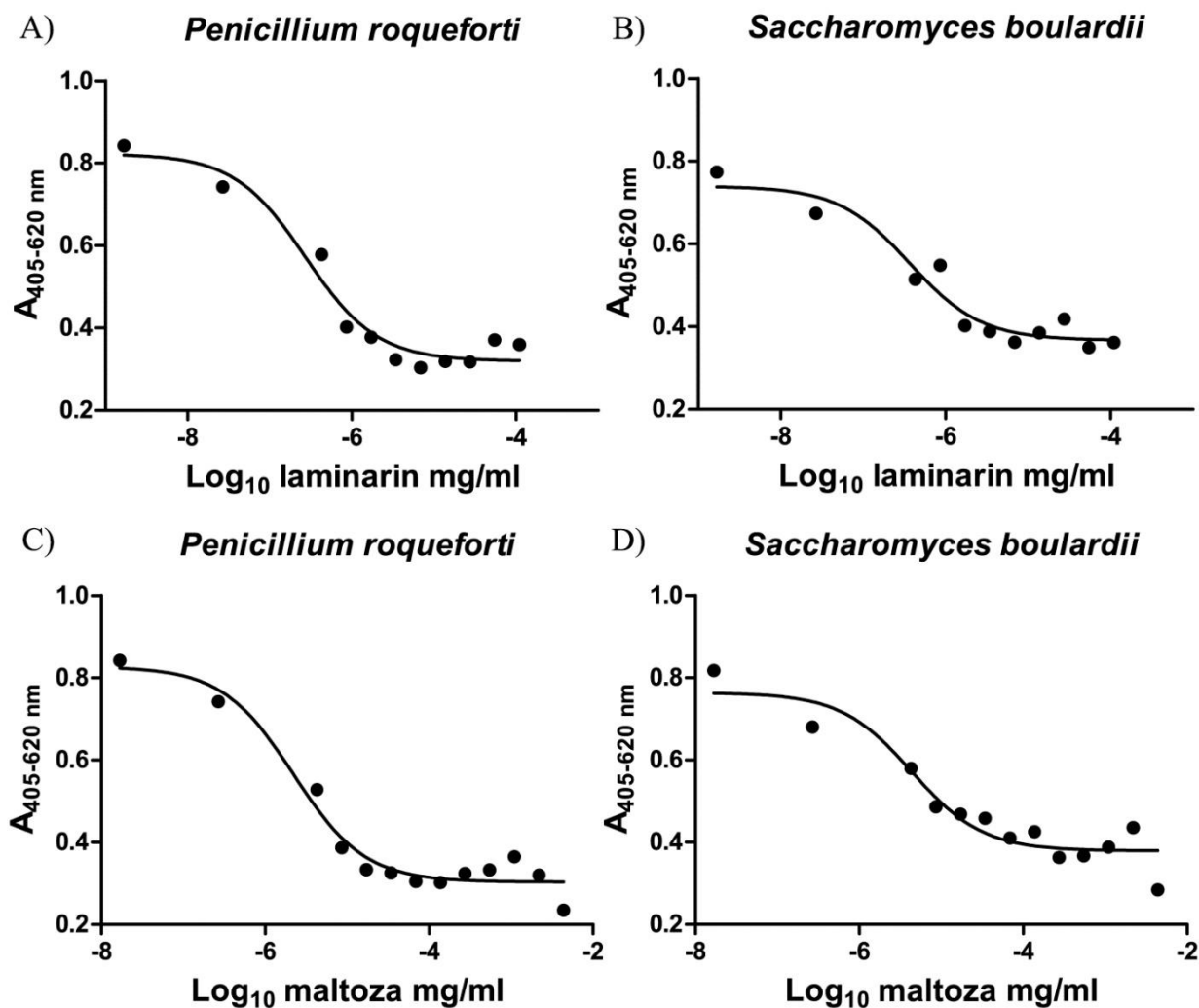
**Slika 4.8. Inhibicija vezivanja BanLec-a:** A) Inhibicija vezivanja BanLec-a za dve vrste kvasca *P. roqueforti* i *S. boulardii*, korišćenjem  $\beta$ -glukana iz *S. cerevisiae*. Inhibicija vezivanja BanLec-a za *P. roqueforti*: B) upotrebom individualnih monosaharida i C) upotrebom mešavine monosaharida (glukoza, manoz i galaktoza). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.

Polovina maksimalne inhibitorne koncentracije (IC<sub>50</sub>) za β-glukan dobijen iz *S. cerevisiae* pri vezivanju BanLec-a za *S. boulardii* bila je 1,81 μg mL<sup>-1</sup> (interval pouzdanosti od 95%: 0,82 – 3,97 μg mL<sup>-1</sup>), a pri vezivanju BanLec-a za *P. roqueforti* IC<sub>50</sub> bila je 1,10 μg mL<sup>-1</sup> (0,62 – 1,95 μg mL<sup>-1</sup>).

Uticaj vezivanja individualnih monosaharida na inhibiciju vezivanja BanLec-a za *P. roqueforti*, takođe je testiran, **Slika 4.8B**. IC<sub>50</sub> za glukozu bio je 0,77 mg mL<sup>-1</sup> (0,23 – 2,58 mg mL<sup>-1</sup>), za manozu 1,27 mg mL<sup>-1</sup> (0,32 – 5,07 mg mL<sup>-1</sup>), dok galaktoza nije dovela do inhibicije ove interakcije.

S obzirom, na prethodno dobijene rezultate koji su pokazali da su β-glukan, glukozu i manozu inhibitori vezivanja BanLec-a za gljive, odlučili smo da testiramo još dva potencijalna inhibitora i to: laminarin- jedinjenje koje u svom sastavu poseduje β-(1-3)-glukan i D-maltozu.

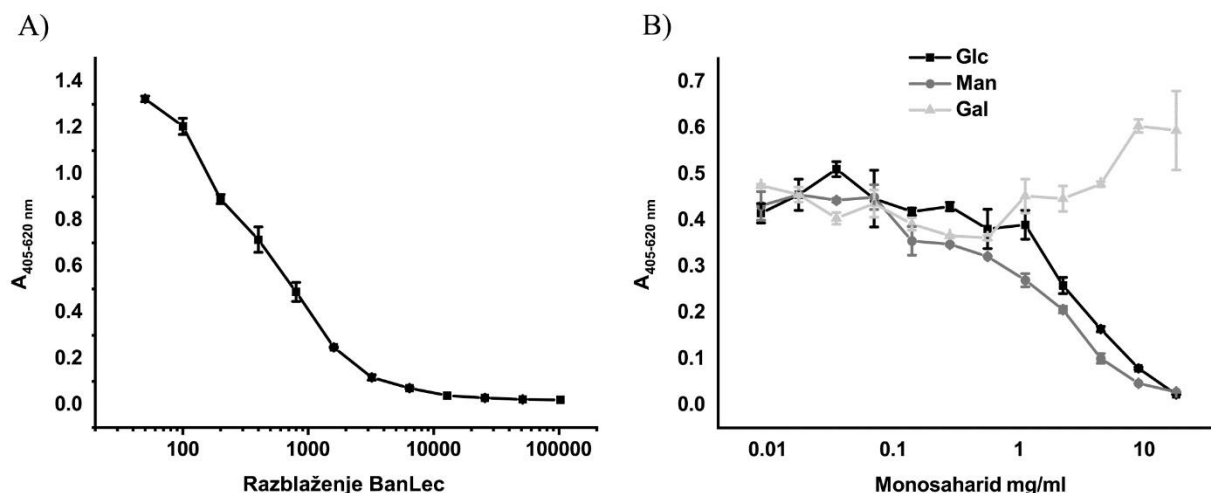
Laminarin je inhibirao vezivanje BanLec za *P. roqueforti* sa IC<sub>50</sub> od 0,26 ng mL<sup>-1</sup> (0,12 – 0,55 ng mL<sup>-1</sup>) i *S. boulardii* od 0,33 ng mL<sup>-1</sup> (0,14 – 0,77 ng mL<sup>-1</sup>). D-maltoza je inhibirala vezivanje BanLec za *P. roqueforti* sa IC<sub>50</sub> od 2,24 ng mL<sup>-1</sup> (1,16 – 4,33 ng mL<sup>-1</sup>) i *S. boulardii* od 3,42 ng mL<sup>-1</sup> (2,1 – 5,57 ng mL<sup>-1</sup>), **Slika 4.9**.



**Slika 4.9.** Inhibicija vezivanja BanLec-a za *P. roqueforti* sa: A) laminarinom, C) D-maltozom; i za *S. boulardii* sa: B) laminarinom, D) D-maltozom.

Korišćenjem dvanaest razblaženja BanLec-a, testirali smo vezivanje BanLec-a direktno za  $\beta$ -glukan. Titraciona kriva vezivanja BanLec-a za  $\beta$ -glukan prikazana je na **Slici 4.10A**.

Pedeset procenata inhibicije vezivanja BanLec-a za  $\beta$ -glukan, u ELLSA postiže se sa  $4,33 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $2,23\text{-}8,41 \text{ mg mL}^{-1}$ ) glukoze, sa  $1,72 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $1,03\text{-}2,87 \text{ mg mL}^{-1}$ ) manoze, dok galaktoza nema nikakvog uticaja na vezivanje (**Slika 4.10B**).



**Slika 4.10. Vezivanje BanLec-a za  $\beta$ -glukan-om iz *S. cerevisiae* ELLSA.** A) Kriva vezivanja BanLec-a; B) Inhibicija vezivanja BanLec-a za  $\beta$ -glukan korišćenjem mešavine monosaharida: glukoze, manoze i galaktoze. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.

U ovoj studiji koristili smo tri manoze vezujuća lektina: LCA koji prepoznaje  $\alpha$ -vezane manozne residue, ConA koji prepoznaje manozu u konfiguraciji 3,6-di-O-( $\alpha$ -Man) $\alpha$ Man i BanLec. Oba testirana soja *C. albicans* pokazuju veoma nizak nivo vezivanja LCA, dok se ConA vezivao samo za jedan soj. Sa druge strane vezivanje *S. cerevisiae* i *C. neoformans* registrovano je za oba lektina iz čega se može zaključiti da je razlog odsustva vezivanja za *C. albicans* ili sojna specifičnost ili posledica metode kultivacije. BanLec kao treći manozu vezujući lektin vezivao je sve tri vrste gljiva, usled jasne razlike u afinitetu vezivanja u odnosu na navedena dva lektina gde se on pokazao kao primarni receptor za  $\beta$ -glukan koji se ekspirira na površini gljiva.

Od svih testiranih mikroorganizama, signal vezivanja BanLec-a detektovan je jedino kod gljiva, što implicira da bi i ostale vrste gljiva bogate  $\beta$ -glukanom vezivale ovaj lektin. Afinitet vezivanja prirodnog BanLec-a prethodno je opisan kao neobičan s obzirom na mogućnost prepoznavanja  $\beta$ -1,3-vezanih glukozil oligosaharida, kao i  $\beta$ -1,6-vezanih glukozil terminalnih grupa (gentiobiozil grupe) koje se pojavljuju u mnogim fungalnim  $\beta$ -1,3/1,6-vezanim polisaharidima<sup>185, 186</sup>.

Upravo specifično selektivno vezivanje lektina za dostupne površinske saharide mikroorganizama je fenomen koji bi mogao da se iskoristi u dizajnu specifičnih markera za identifikaciju mikroorganizama. Na primer, vezivanje RCA<sub>120</sub> površinski za *L. casei* DG potvrđuje postojanje galaktoznih rezidua na površini ovog soja. Yasuda je sa kolegama u lektinskom mikroeseju pri testiranju nekoliko različitih sojeva *L. casei* DG pokazao je da jedan

od sojeva izolovan iz pljuvačke vezuje RCA<sub>120</sub><sup>187</sup>, što odgovara i rezultatima koje smo mi dobili u ovoj studiji. Nedavno je pronađeno da zapravo *L.casei* DG sintetizuje razgranat heteroegzopolisaharid sa ponavljajućom L-ramnozom, D-galaktozom i N-acetil- D galaktozaminom u odnosu 4:1:1<sup>188</sup>. Zbog pronalaska potvrde u literaturi ovaj mikroorganizam može da se koristi kao pozitivna kontrola vezivanja lektina RCA<sub>120</sub>.

Kao što smo prethodno spomenuli, osim afiniteta prema manozi, postoje literaturni podaci o tome da BanLec vezuje  $\alpha$ -1,3- vezujuće glukozil residue<sup>185</sup> i gentiobiozil grupe koje se pojavljuju u mnogim fungalnim  $\beta$ -1,3/1,6-vezujućim polisaharidima<sup>186</sup>, što je potvrđeno tehnikama kvantitativne precipitacije, haptenske inhibicije precipitacije i izotermalnom titracijom kalorimetrijom. Ovde smo upotrebom ELLSA metodologije pokazali da BanLec ima drastično drugačiji afinitet u odnosu na ostalih 7 lektina i da bez obzira na to što ima mogućnost vezivanja različitih struktura u ovom eseju specifično vezuje površinske  $\beta$ -glukane.

Dobijeni rezultati pokazuju da se "screening" sa rBanLec-om, može preliminarno koristiti za detektovanje prisustva  $\beta$ -1,3/1,6-vezujućih polisaharida koji postoje na površini gljiva.

### 4.3 Validacija ELLSA metode

Literaturni podaci su potvrdili rezultate dobijene u toku procesa optimizacije ELLSA metode. Naredni korak, koji bi kompletirao mogućnosti upotrebe ove metode bio je validacija ELLSA metode.

Zadatak validacije jedne analitičke metode je demonstracija pogodnosti i pouzdanosti te metode u planirane svrhe. Tipične validacione karakteristike koje treba definisati, pri validaciji jednog procesa su: 1) specifičnost, 2) tačnost, 3) linearnost, 4) opseg, 5) preciznost i 6) senzitivnost. Validacija ELLSA je sprovedena u skladu sa smernicama EMA (ICH M5, EWG,2005) i urađena definišući većinu navedenih karakteristika, u skladu sa specifičnostima ovog testa<sup>189</sup>.

Specifičnost određuje mogućnost metode da razlikuje izabrani analit od drugih sličnih analita ili komponenti. Specifičnost može biti potvrđena dodavanjem većih koncentracija ciljnog analita u uzorak ili inhibicijom ciljnog analita.

Tačnost analitičke metode opisuje razliku između očekivane vrednosti i eksperimentalno dobijene vrednosti u toku eksperimenta, upotrebom apsolutne ili relativne greške.

Linearnost se koristi za određivanje opsega analitičke metode, koji je definisan kao deo krive u kom se nalazi dovoljno prihvatljivih vrednosti. Upravo ovaj linearni segment standardne krive (tj. standardna prava) može da se koristi kako bi se kvantifikovao analit. ELLSA može da se karakteriše linearnošću, s obzirom na mogućnost formiranja opsega serijskih razblaženja koja rezultuju linearnim segmentom u okviru krive, ali se to u ovom slučaju ne može iskoristiti za kvantifikaciju.

Opseg se određuje na osnovu linearnosti i dobijenih vrednosti koje spadaju u opseg odgovarajuće tačnosti i preciznosti. Opseg je određen gornjim i donjim limitom detekcije. Gornji limit detekcije je definisan kao srednja vrednost 10 duplikata maksimalno dostignute absorbance u linearnom delu standardne krive, od koje su oduzete 3 standardne devijacije.

Donji limit detekcije je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može pouzdano kvantifikovati, sa prihvaćenom tačnošću i preciznošću. U praksi ovo je srednja vrednost najmanjeg izmerenog rezultata u linearnom delu krive na koji se dodaju 3 standardne devijacije.

Preciznost metode, predstavlja meru reproducibilnosti zabeleženih rezultata, to znači da je metod precizniji ukoliko su rezultati dobijeni u nezavisnim testovima sličniji jedni drugima. Preciznost se definiše pomoću dva parametra: standardne devijacije (SD) i koeficijenta varijacije (CV). Preciznost može da se odredi pomoću dve vrste merenja: 1) repetitivnost – koja pokazuje da isti uzorak testiran više puta unutar jednog izvođenja eksperimenta daje isti rezultat; i 2) reproducibilnost – koja pokazuje da isti uzorak testiran više puta istim testom u različitim laboratorijama daje isti rezultat.

Senzitivnost testa obuhvata praćenje efekata malih slučajnih grešaka koje mogu da utiču na kvantifikacione i kvalitativne karakteristike metode, kao što su npr. temperatura rastvora, vreme inkubacije i temperature inkubacije, broj pranja, vreme bojenja itd. U procesu validacije ELLSA metode, bilo je prvo potrebno definisati spektar mikroorganizama koje ćemo koristiti, a to je urađeno na osnovu rezultata koji su bili dostupni nakon optimizacije ELLSA. Prošli smo spektar na 33 mikroorganizma, različitog porekla, karakteristika i morfologije od kojih su 27 bile bakterije: 7 različitih serotipa *Salmonella*-e, 14 različitih bakterija razreda *Firmicutes* i 7 *Proteobacteria* i 5 različitih vrsta gljiva.

Za proces validacije odabrani su rekombinantno proizvedeni BanLec i komercijalno dostupan RCA<sub>120</sub> dobijen iz semena biljke *Ricinus communis*. Naime, na osnovu rezultata dobijenih u procesu optimizacije gde smo detektovali jedinstveni signal između BanLec-a i *C. albicans* i s obzirom na njegovu specifičnost prema  $\alpha$ -glikozil,  $\alpha$ -manozil terminalnim neredukujućim krajevima i 3-O- $\alpha$ -D glukopiranozidu<sup>185</sup>, ali i zbog afiniteta vezivanja prema  $\beta$ -1,3-glukozil oligosaharidima i gentiobiozil grupama<sup>186, 190, 191</sup>, odabrali smo BanLec kao lektin od interesa. Drugi lektin, RCA<sub>120</sub> odabran je zbog svog potpuno drugačijeg afiniteta vezivanja u odnosu na BanLec. RCA<sub>120</sub> se vezuje za  $\beta$ -galaktozil neredukujuće krajeve, sa većim afinitetom ka Gal $\beta$ 1-4GlcNAc nego ka Gal $\beta$ 1-3GlcNAc<sup>192, 193</sup>. S obzirom da su glavne osobine galaktana antiviralne, antibakterijske i imunoregulatorne aktivnosti, oni su potencijalno od velikog biomedicinskog interesa<sup>194</sup>. Protočna citometrija je odabrana kao kontrolna metoda za detekciju interakcija između lektina i površinskih polisaharidnih struktura mikroorganizama, s obzirom da može da pruži kvantitativnu meru raspšene svetlosti i emitovane fluorescence od desetina hiljada individualnih ćelija u samo jednoj analizi. Mera emitovane fluorescence proporcionalna je količini fluorohrome obeleženog proteina vezanog za ćelije koji je odgovarajući parametar za određivanje specifične gustine receptora<sup>195</sup>.

Hemijsko obeležavanje lektina teoretski može dovesti do modifikacije u sekundarnoj ili tercijalnoj strukturi čime dolazi do modifikacije mesta vezivanja i potencijalno promene u konstanti vezivanja. Za izvođenje ELLSA metode oba lektina su biotinirovana, dok su u protočnoj citometriji korišćeni himerni BanLec sa pojačanim zelenim fluorescentnim proteinom (eGFP, PDB 4EUL), za koji je pokazano da ne dovodi do promene sekundarne strukture lektinskog molekula<sup>196</sup> i fluoresceinom obeleženi RCA<sub>120</sub>. U oba slučaja hemijskog obeležavanja korišćen je isti hemijski proces.

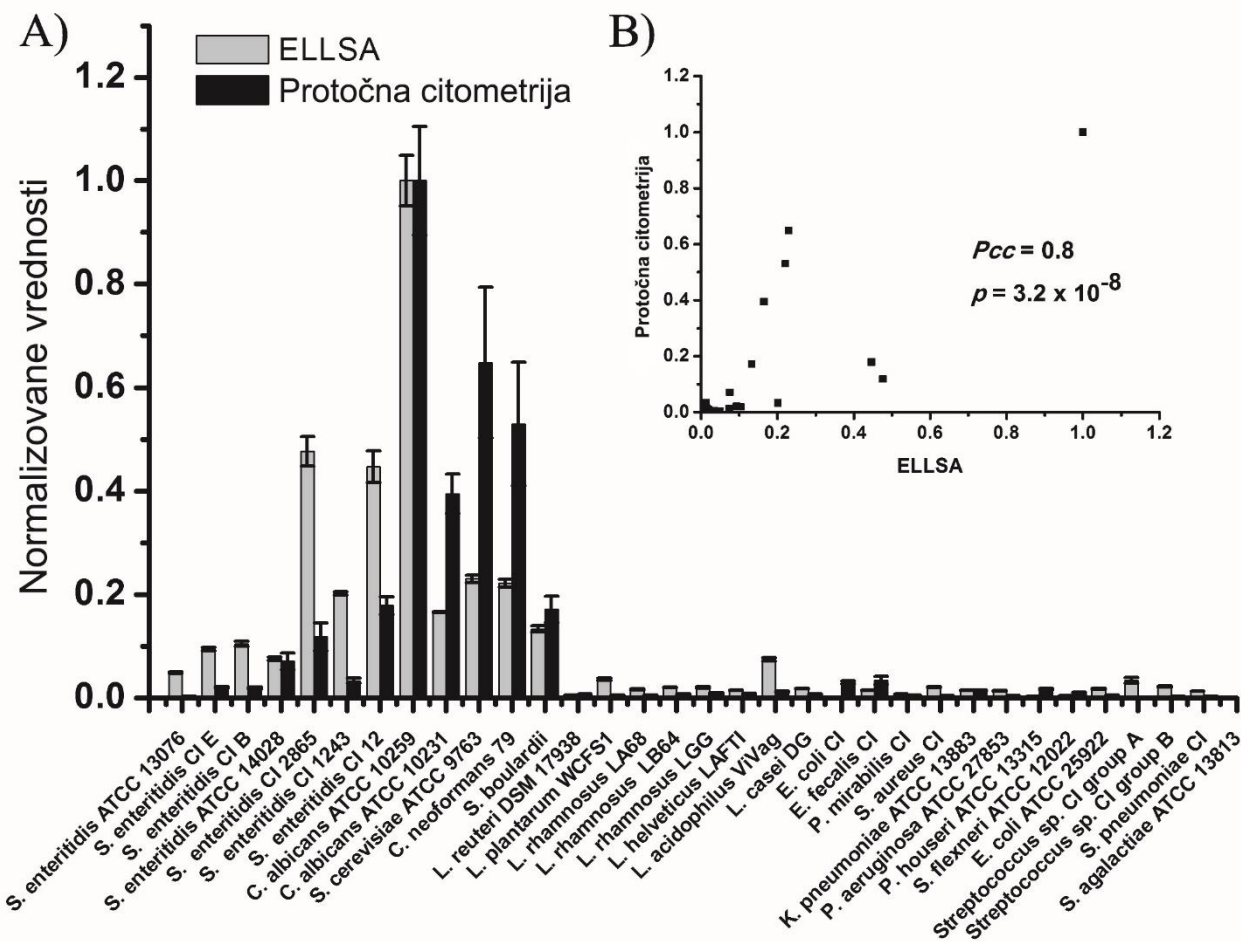
### 4.3.1 Specifičnost vezivanja lektina za mikroorganizme

Specifičnost vezivanja lektina testirana je interakcijom između BanLec-a i RCA<sub>120</sub> sa jedne strane i spektrom različitih mikroorganizama sa druge strane.

Jasan signal vezivanja BanLec-a sa mikroorganizmima detektovan je i ELLSA i protočnom citometrijom na sve testirane ćelije kvasca, što je potvrdilo ranije eksperimente, ali i za neke sojeve *Salmonella*, **Slika 4.11A**, što je predstavljalo nov nalaz. Međutim, primetno je da intenzitet signala nije bio jednak tj. da vezivanje za ćelija kvasca nije uniformno, pa tako recimo vezivanje lektina za *C. albicans* ATCC 10259 rezultuje izuzetno jakim signalom, dok se pri vezivanju za *S. boulardii* detektuje znatno slabiji signal.

ELLSA metoda ne samo da pokazuje mogućnost detektovanja signala različite jačine između različitih vrsta mikroorganizama, već je očigledno da ima mogućnost detektovanja signala različitog intenziteta između različitih sojeva unutar jedne vrste. Pa tako npr. pri testiranju različitih serotipa *Salmonella*-e, ostvarene interakcije takođe nisu jednake, a posebno su se istakli signali jačeg intenziteta pri vezivanju lektina za serotipe *S. typhi* 12 i *S. typhimurium* 2865. Kod ostalih mikroorganizma nije detektovan značajan signal vezivanja za BanLec, ni upotrebom ELLSA metode, niti protočnom citometrijom (**Slika 4.11A**).

Korelacija između vrednosti signala vezivanja lektina i mikroorganizama dobijenih ELLSA i protočnom citometrijom, rezultirala je Pirsonovim korelacionim koeficijentom ( $P_{cc}$  – Engl. Pearson's Coefficient of Correlation) od 0,8 (**Slika 4.11B**).

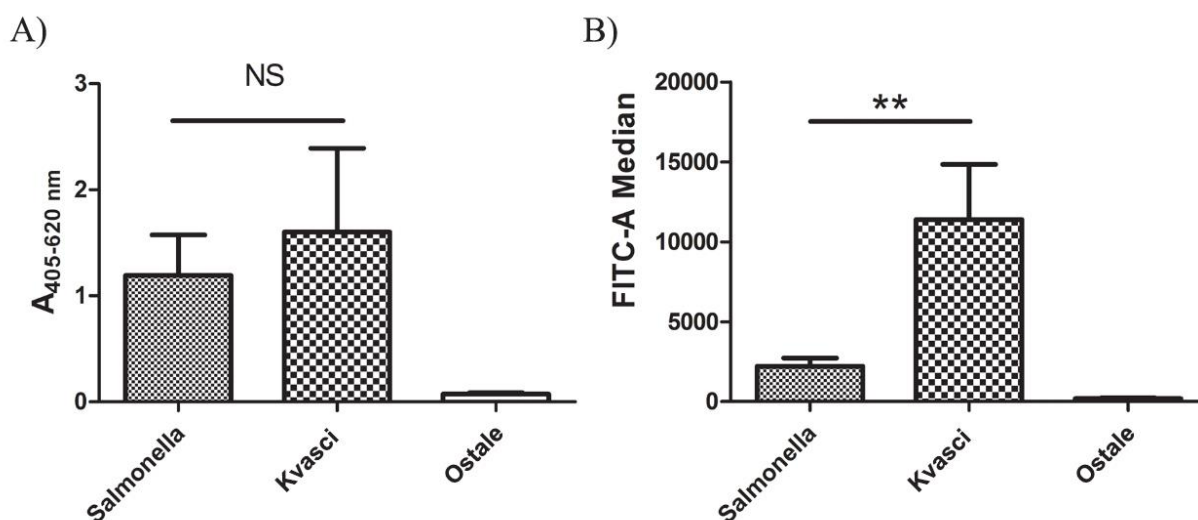


**Slika 4.11. Interakcija BanLec-a i mikroorganizama:** A) Signali vezivanja BanLec-a za različite mikroorganizme dobijeni različitim metodama, ELLSA - sivi stubići; protočna citometrija – crni stubići. Mikroorganizmi su testirani sa 0,05  $\mu\text{g}$  biotinilovanog BanLec u ELLSA ili sa 1,4  $\mu\text{g}$  BanLec-eGFP u protočnoj citometriji. B) Korelacija između vrednosti signala vezivanja lektina i mikroorganizama

dobijenih ELLSA-om i protočnom citometrijom. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.

Očigledne razlike u registrovanom intenzitetu signala detektovane su između metoda, pomoću ELLSA su registrovani jači signali vezivanja lektina za *Salmonella*-e u odnosu na signale dobijene protočnom citometrijom, dok su signali većeg intenziteta dobijeni vezivanjem lektina za kvasce protočnom citometrijom, sem kod *C. albicans* ATCC10259, gde su obe metode dale signal visokog intenziteta. Ono što je bitno napomenuti jeste da je ELLSA metoda pokazala manje varijacije vezivanja u odnosu na protočnu citometriju. Drugim rečima, uočeno je izvesno neslaganje u intenzitetu dobijenih signala između dve metode.

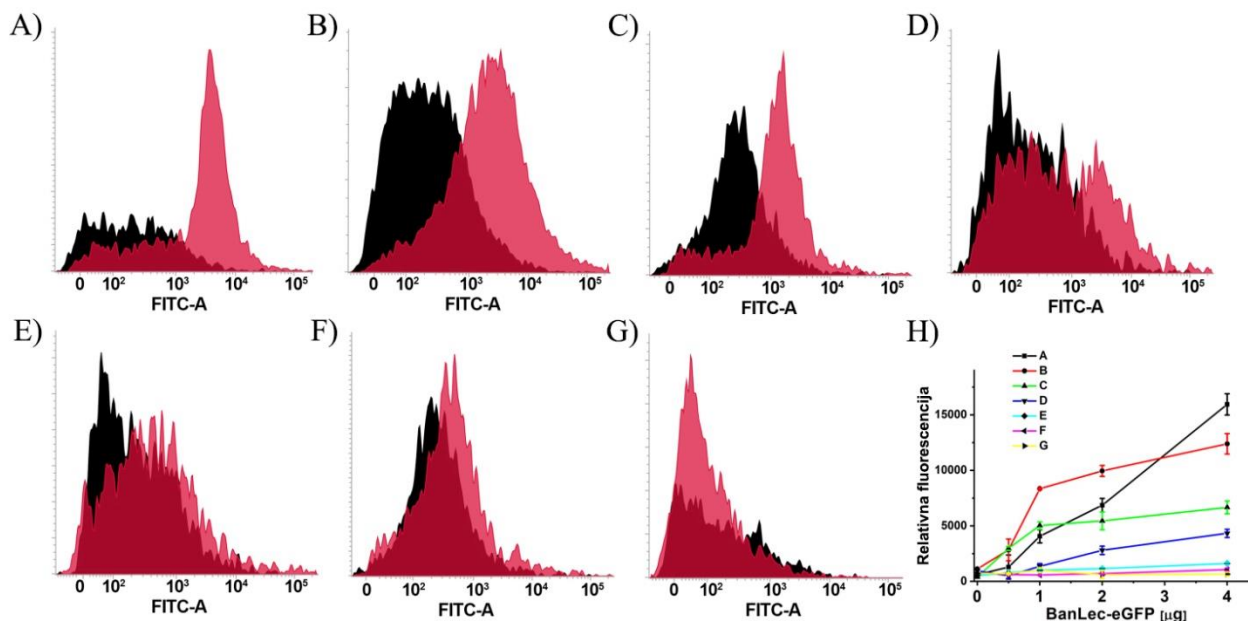
Kako bi bolje proučili ovaj fenomen, uporedili smo srednje vrednosti signala vezivanja BanLec-a za bakterije *Salmonella* i kvasce, dobijene ELLSA i dobijene protočnom citometrijom. Intenzitet signala vezivanja dobijen ELLSA nije pokazao značajnu razliku između *Salmonella* i kvasaca (Slika 4.12A). Bitne razlike u intenzitetu signala vezivanja primećene su pri vezivanju BanLec-eGFP za *Salmonella*-e i za selektovane ćelije kvasca koji su dobijeni izvođenjem protočne citometrije (Slika 4.12B).



**Slika 4.12. Vezivanje BanLec-a za mikroorganizme u:** A) ELLSA i B) protočnoj citometriji. Grupe su formirane na osnovu pozitivne sposobnosti vezivanja lektina i tipa mikroorganizama: 1) *Salmonella* – u koju spadaju *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Typhimurium* CI 2865, *S. Typhi* CI 1243, *S. Typhi* CI 12; 2) kvasci – u koju spadaju *C. albicans* ATCC 10259, *C. albicans* ATCC 10231, *S. cerevisiae* ATCC 9763, *C. neoformans* 79; 3) Ostale – ostali testirani mikroorganizmi. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama. \*\* -  $p=0,006$ .

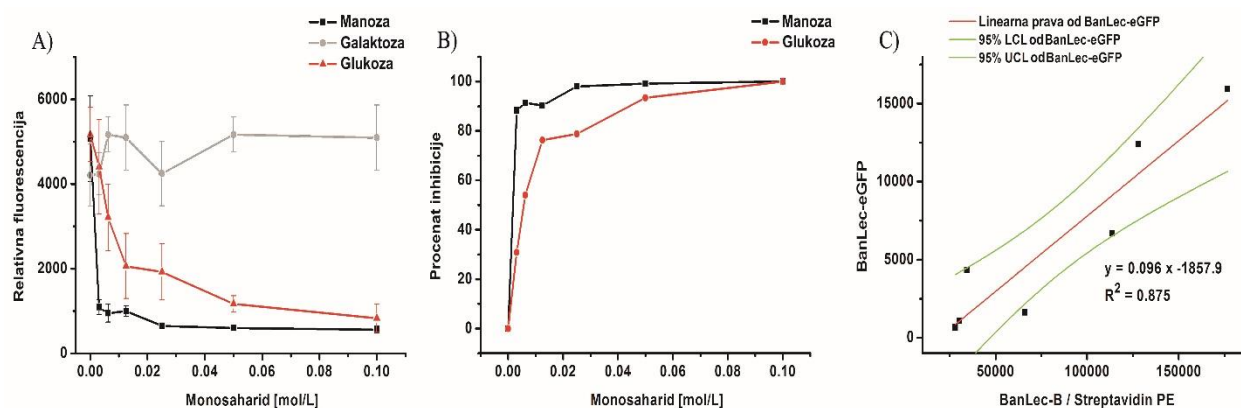
Pretpostavka je da usled različitih dimenzija mikroorganizama, broj fluorescentno obeleženih lektina po mikroorganizmu nije jednak, te se na većim mikroorganizmima, kao što su kvasci, nalazi više obeleženih molekula, što daje signal većeg intenziteta. ELLSA se u tom smislu razlikuje, jer je u ELLSA najmanje duplo manja površina dostupna za interakciju sa obeleženim lektinima, a signal zavisi i od enzimske reakcije, što može umanjiti ovu razliku.

Usled velike razlike vrednosti signala vezivanja *Salmonella* i kvasaca dobijene protočnom citometrijom, odlučili smo da proverimo vezivanje različitih sojeva *Salmonella* za BanLec-eGFP. Kao što je prikazano na **Slici 4.13**, vezivanje bakterija nije uniformno i postoji razlika u afinitetu vezivanja između sojeva, od kojih se najviše ističu vezivanje serotipa Typhi izolata 12 i vezivanje serotipa Typhimurium izolata 2865 (**Slika 4.13A i B**). Detektovano je i vezivanje *Salmonella enterica* serotip Typhimurium ATCC 14028 i serotip Typhi izolat 1243 (**Slika 4.13C i D**). Kod ostalih sojeva *Salmonella* nije detektovano vezivanje (**Slika 4.13E, F i G**). Zavisnost relativne fluorescencije (FITC-A Median) od koncentracije BanLec-eGFP korišćenog za obeležavanje različitih sojeva *Salmonella* prikazano je na **Slici 4.13H**.



**Slika 4.13. Analiza vezivanja BanLec-eGFP za različite sojeve *Salmonella enterica*, protočnom citometrijom.** A) serotip Typhi klinički izolat 12; B) serotip Typhimurium izolat 2865; C) serotip Typhimurium ATCC 14028; D) serotip Typhi klinički izolat 1243; E) serotip Typhimurium izolat B; F) serotip Enteritidis klinički izolat E; G) serotip Enteritidis ATCC 13076; Crni histogram – neobeležene bakterije; roze histogram – bakterije obeležene sa 14 µg BanLec-eGFP; H) Zavisnost FITC-A Medijana, obeležena relativna fluorescencija koncentracija BanLec-eGFP himera. Svi sojevi su obeleženi kao što je prethodno opisano.

Vezivanje BanLec-eGFP je potpuno zavisno od interakcija lektina sa ugljenim hidratima, a kompletna inhibicija reakcije je postignuta upotrebom manoze i glukoze (**Slika 4.14A i B**). Pokazali smo i da galaktoza nema mogućnost inhibicije ove reakcije čak ni pri većim koncentracijama od 0,1 M. Inhibicija vezivanja postignuta je sa malom količinom manoze,  $IC_{50} \leq 1,7$  mM, dok je za inhibiciju vezivanja glukozom bila potrebna skoro četiri puta veća količina,  $IC_{50} \leq 7,4$  mM (**Slika 4.14B**).



**Slika 4.14.** Inhibicija vezivanja BanLec-eGFP za *Salmonella enterica*, serotip Typhimurium izolat 2865 sa različitim količinama monosaharida; paneli A) i B) i korelacija obeležavanja sa BanLec-eGFP i obeležavanja biotiniolovanim BanLec-om i streptavidin-fikoeritrinom (PE) – panel C), upotrebom protočne citometrije. Svaka tačka je urađena u kvadriplikatu. Panel: A) relativna fluorescencija; B) procenat inhibicije; C) korelacija. U eksperimentima korelacije, korišćeno je 4  $\mu\text{g}$  BanLec-eGFP i 0,5  $\mu\text{g}$  biotiniolovnog BanLec-a sa 0,2  $\mu\text{g}$  streptavidin-PE (eBioscience). LCL – donji limit pouzdanosti; UCL – gornji limit pouzdanosti.

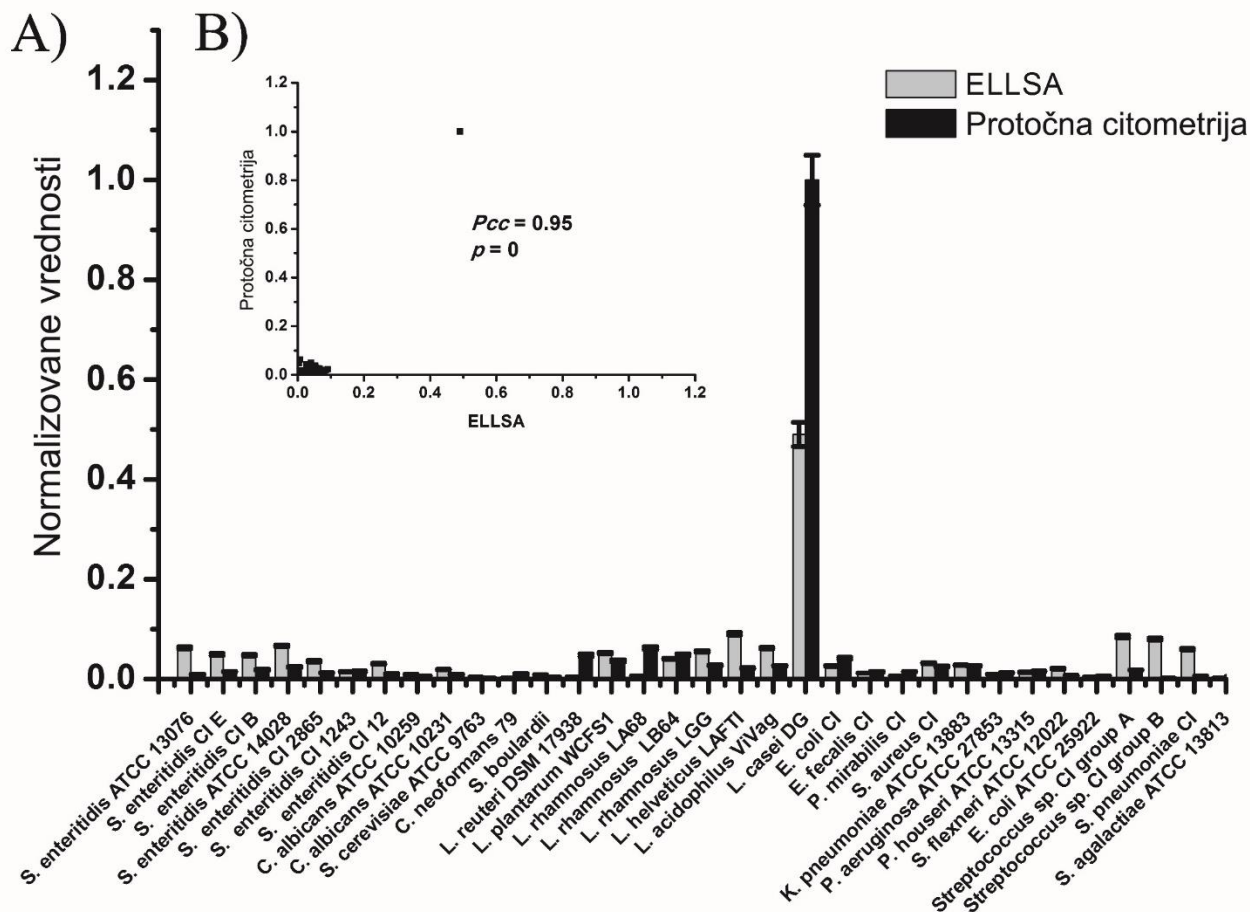
Zatim smo napravili korelaciju između rezultata vezivanja BanLec-eGFP za *Salmonella enterica* serotip Typhimurium izolat 2865 i biotiniolovnog BanLec-a i streptavidin-PE za isti mikroorganizam (**Slika 4.14C**). Vrednost korelacionog koeficijenta dobijenog upoređujući vrednosti dva načina detekcije iznosi 0,875, sa niskim nivoom optimizacije, što je statistički značajna korelacija ( $p = 0,0019$ ).

Obe metode i ELLSA i protočna citometrija detektovale su vezivanje BanLec-a za različite *Salmonella* serotipove, čime je potvrđeno prisustvo manoze na njihovoj površini<sup>192, 197</sup>. Vezivanje BanLec-a za ćelije kvasca takođe je očekivano zbog prisustva kako manoznih struktura, tako i  $\beta$ -glukanskih struktura na njihovoj površini<sup>198-201</sup>. Tako da smo pomoću ovih metoda uspeali da definišemo prisustvo određenih glikanskih struktura na različitim mikroorganizmima, što je u skladu sa njihovim poznatim glikozilacijama.

Kako bi potvrdili specifičnost ELLSA metode, a ujedno proverili i mogućnost poređenja u odnosu na rezultate dobijene protočnom citometrijom, testirali smo sve mikroorganizme korišćene u ispitivanju vezivanja BanLec-a sada u ispitivanju vezivanja RCA<sub>120</sub> lektina, koji pokazuje afinitet vezivanja za galaktozu.

Obe metode su detektovale signal vezivanja RCA<sub>120</sub> pri interakciji sa *L. casei* DG, čime je potvrđeno prisustvo glikana koji sadži galaktozu u odgovarajućoj glikozidnoj vezi, dok ovaj lektin nije vezivao ostale testirane mikroorganizme (**Slika 4.15A**). Upravo iz ovog razloga, gde RCA<sub>120</sub> pokazuje specifičnost vezivanja za 1 od 33 testirana mikroorganizma u obe metode, korelacija između vrednosti signala vezivanja lektina i mikroorganizama dobijenih ELLSA i protočnom citometrijom, rezultirala je visokim Pirsonovim koeficijentom korelacije ( $P_{cc}$ ) od 0,95, što odgovara rezultatima objavljenim od strane Freitas-a, 2003. godine<sup>202</sup> (**Slika 4.15B**). Naime, pokazano je da *L. casei* DG ima galaktozu na površini i da je to upravo čini jedinstvenom u odnosu na sve ostale testirane sojeve *Lactobacillus*-a, koji imaju potpuno drugačije glikane, a to govori u prilog da različiti sojevi mikroorganizama mogu imati unikatne površinske glikane. Ova tvrdnja može biti istinita za pojedine bakterijske vrste poput *S.*

*pneumoniae* kod koje postoji preko 95 različitih serotipova, sa polisaharidnim kapsulama potpuno različitih karakteristika, mada i tu se ne radi o raznovrsnosti na nivou pojedinačnih sojeva, ali definitivno nije primjenjivo kod svih bakterijskih vrsta, s obzirom da površinski glikani mogu biti specifični za vrstu<sup>203</sup>.



**Slika 4.15. Interakcija  $RCA_{120}$  i mikroorganizama:** A) Signali vezivanja  $RCA_{120}$  za različite mikroorganizme, ELLSA - sivi stubići i protočnom citometrijom – crni stubići. Mikroorganizmi su testirani sa  $0,115 \mu\text{g}$  biotinihovanim  $RCA_{120}$  ili sa  $5 \mu\text{g}$   $RCA_{120}$ -FITC. B) Korelacija između vrednosti signala vezivanja lektina i mikroorganizama dobijenih ELLSA i protočnom citometrijom. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.

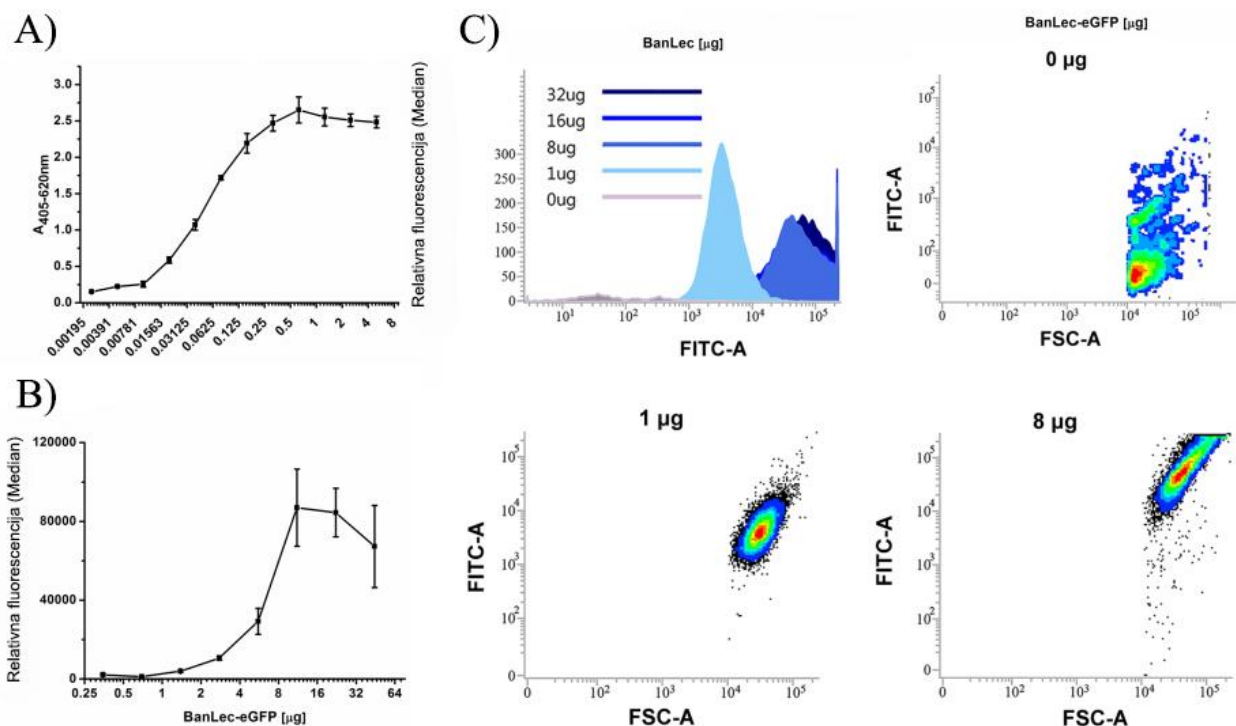
Pomoću obe metode detektovali smo izuzetno visok signal vezivanja  $RCA_{120}$  za površinske polisaharidne strukture bakterije *L. casei* DG.

#### 4.3.2 Tačnost ELLSA i protočne citometrije

Kako bi uporedili tačnost obe metode, odabrali smo po jedan mikroorganizam za svaki lektin u zavisnosti od jačine intenziteta signala koji je detektovan. *C. albicans* je odabran za BanLec, a *L. casei* DG za  $RCA_{120}$ . Titracioni eksperimenti su izvršeni za svaki uzorak u kvadriplikatu.

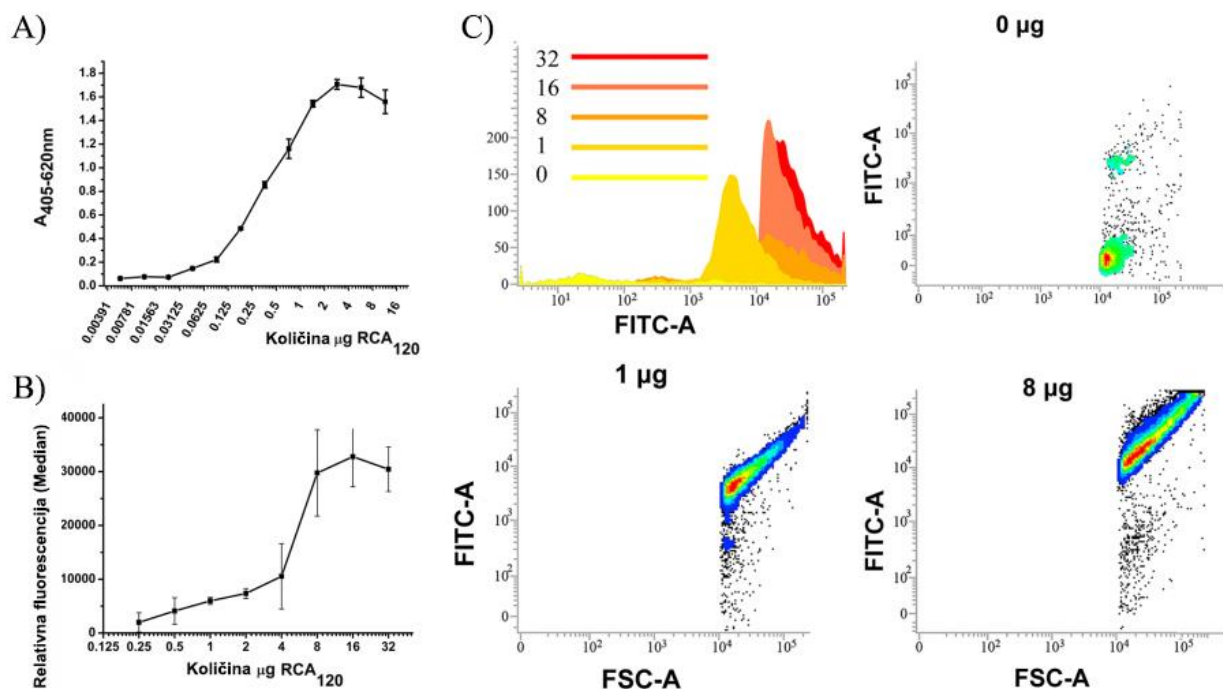
Na Slici 4.16, prikazano je vezivanje BanLec-a za *C. albicans*. U ELLSA metodi (Slika 4.16A) saturacija je postignuta sa  $0,3 \mu\text{g}$  biotinihovanim BanLec-a, dok je u protočnoj citometriji (Slika 4.16B) saturacija postignuta sa daleko više BanLec-eGFP, tj.  $11,1 \mu\text{g}$ .

Ukoliko bi računali u molovima, efektivno 10 puta manja količina je potrebna da bi se postigao plato u ELLSA, što govori u prilog da je ELLSA metoda osjetljivija. Pored navedenog, u protočnoj citometriji dobijene su daleko više vrednosti standardnih devijacija.



**Slika 4.16. Titracije BanLec-a za *C. albicans*:** A) Titracija biotinilovanog BanLec-a za *C. albicans* u ELLSA; prikazane su srednje vrednosti standardnih devijacija. B) Titracija BanLec-eGFP za *C. albicans* u protočnoj citometriji; prikazane su srednje vrednosti standardnih devijacija. C) Analiza interakcija različitih koncentracija fluorescentno obeleženog BanLec-eGFP sa *C. albicans* u protočnoj citometriji.

Vezivanje  $\text{RCA}_{120}$  za *L. casei* DG prikazano je na **Slici 4.17**. U ELLSA metodi (**Slika 4.17A**) saturacija je postignuta sa 2  $\mu\text{g}$  biotinilovanog  $\text{RCA}_{120}$ , dok je u protočnoj citometriji (**Slika 4.17B**) saturacija postignuta, opet, sa daleko više proteina, tj. 8  $\mu\text{g}$ . Kao što se može videti na **Slici 4.17**, opet su mnogo veće standardne devijacije dobijene metodom protočne citometrije.



**Slika 4.17. Titracije RCA<sub>120</sub> za *L. casei* DG:** A) Titracija biotiničanog RCA<sub>120</sub> za *L. casei* DG u ELLSA; prikazane su srednje vrednosti standardnih devijacija. B) Titracija fluorescentno obeleženog RCA<sub>120</sub> za *L. casei* DG u protočnoj citometriji; prikazane su srednje vrednosti standardnih devijacija. C) Analiza interakcija različitih koncentracija fluorescentno obeleženog RCA<sub>120</sub> sa *L. casei* DG u protočnoj citometriji.

### 4.3.3 Linearnost ELLSA i protočne citometrije

Jedna od karakteristika validacije analitičkih metoda je linearnost i ovde se ona odnosi na opseg lektinskih razblaženja koja čine linearni segment standardne krive. To je zapravo opseg u kojem ELLSA može da se koristi da bi se kvantifikovala dobijena vrednost absorbance, a određena je upravo linearnim segmentom krive vezivanja.

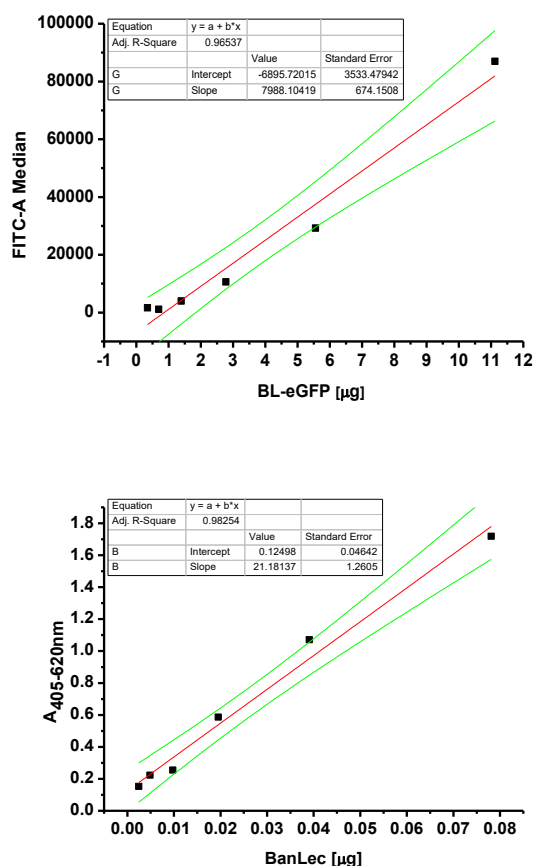
Linearnost je određena vezivanjem BanLec-a za bunare mikrotitarske ploče sa *C. albicans* i vezivanjem RCA<sub>120</sub> za bunare mikrotitarske ploče sa *L. casei*, pošto su ta dva lektina pokazala izrazito jak signal vezivanja za ova dva mikroorganizma. Pripremljena su dvostruka serijska razblaženja što je rezultiralo linearnim delom krive pomoću koje su izračunati parametri  $a$  i  $b$  iz jednačine linearnosti  $y=a+b*x$  linearne krive.

Vezivanje oba lektina rezultiralo je visokim koeficijentom determinacije ( $R^2$ ) i to 0,98 za biotiničani BanLec i 0,99 za RCA<sub>120</sub>, u istom zadatom opsegu (**Tabela 4.1**).

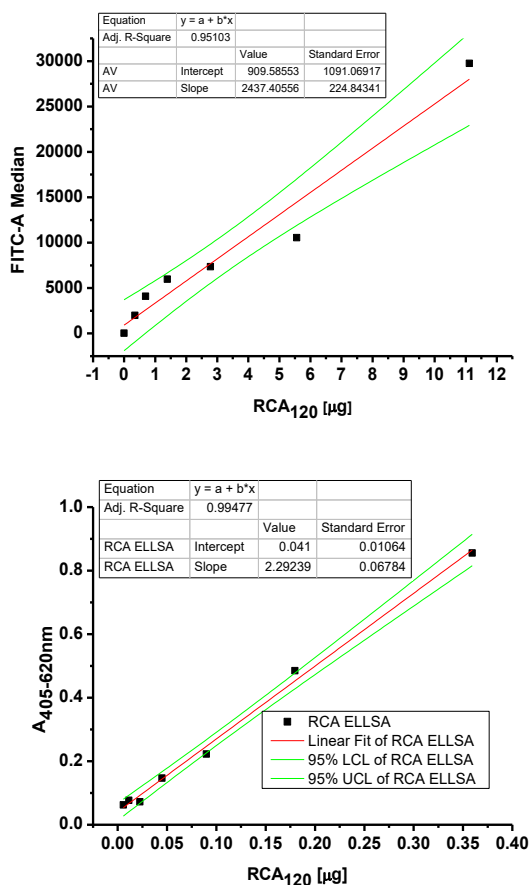
**Tabela 4.1. Određivanje koeficijenta determinacije pri vezivanju biotisanilisanog BanLec-a za *C. albicans* i pri vezivanju RCA<sub>120</sub> za *L. casei* DG.**

	Intercept (a)		Slope (b)		R <sup>2</sup>
	Vrednost	SE	Vrednost	SE	
BanLec/ <i>C.albicans</i>	0,125	0,050	21,181	1,260	0,982
RCA <sub>120</sub> / <i>L.casei</i>	0,041	0,011	2,292	0,067	0,995

Linearnost za RCA<sub>120</sub> dobijena je u opsegu od 0,01 do 0,3 µg, dok je opseg za bionitnisani BanLec od 0,003 do 0,079 µg. Ovi rezultati nam govore da testiranje vezivanja navedenih lektina u ovim opsezima razblaženja može objektivno da se meri, mada to u napravljenoj postavci eksperimenta nije bilo od interesa. Pored navedenog, niži koeficijent determinacije dobijen je paralelnim testiranjem linearnosti u zadatom opsegu protočnom citometrijom, za oba testirana lektina. Opseg linearnosti je uži za ELLSA metodu, u odnosu na protočnu citometriju, ali je R<sup>2</sup> viši u ELLSA (0,99) u odnosu na R<sup>2</sup> protočne citometrije (0,95) (Slika 4.18).



**Slika 4.18. Opseg linearnosti:** A) vezivanja BanLec-eGFP za *C. albicans* u protočnoj citometriji; B) vezivanja BanLec-eGFP za *C. albicans* u ELLSA; C) vezivanja RCA<sub>120</sub> za *L. casei* DG u protočnoj citometriji; D) vezivanja RCA<sub>120</sub> za *L. casei* DG u ELLSA.



Slika 4.18. Nastavak

#### 4.3.4 Preciznost ELLSA i protočne citometrije

Preciznost ELLSA i protočne citometrije, određena je uz pomoć dve vrste merenja: 1) repetitivnosti i 2) reproducibilnosti; obe su definisane uz pomoć dve vrednosti: a) koeficijenta varijacije (CV) i b) standardne devijacije (SD).

Repetitivnost, opisuje varijaciju rezultata uzorka u jednom eksperimentu pri korišćenju jedne metode i u jednoj laboratoriji, izračunata je na osnovu vrednosti kvadriplikata jednog istog uzorka (**Tabela 4.2, Tabela 4.3, Tabela 4.4 i Tabela 4.5**), koristeći formulu:

$$CV_{repeat} = \left\{ \left[ \frac{\sum SD(d)}{n} \right] : \bar{a} \right\} \times 100,$$

SD – standardna devijacija kvadriplikata,

n - broj replikata,

$\bar{a}$  – srednja vrednost kvadriplikata.

Prema literarnim podacima<sup>204</sup>, koeficijent varijacije manji od 10% se smatra zadovoljavajući.

**Tabela 4.2. Repetatibilnost protočne citometrije pri detekciji vezivanja različnih količina BanLec-eGFP za *C. albicans*.**

BanLec-eGFP $\mu\text{g}$	V1	V2	V3	V4	$\bar{X}$	SD	CV repeat %
0,347	1947	1837	2916	1708	2102	551	7
0,695	1149	957	1138	1194	1110	105	2
1,390	4302	4337	3709	3521	3967	414	3
2,780	11075	11679	9287	10448	10622	1022	2
5,560	25333	31228	37586	22850	29249	6575	6
11,120	100816	68510	106674	71744	86936	19601	6
22,240	91395	98070	76309	72031	84451	12305	4
44,480	67557	77895	85605	38000	67264	20864	8

**Tabela 4.3. Repetatibilnost ELLSA pri detekciji vezivanja različnih količina biotinilovanog BanLec za *C. albicans*.**

BanLec-B $\mu\text{g}$	V1	V2	V3	V4	$\bar{X}$	SD	CV repeat %
5	2,453	2,592	2,402	2,487	2,483	0,080	0,8
2,5	2,416	2,506	2,626	2,494	2,510	0,087	0,9
1,25	2,581	2,673	2,382	2,578	2,553	0,122	1,2
0,625	2,456	2,549	2,829	2,773	2,652	0,178	1,7
0,312	2,456	2,549	2,321	2,549	2,469	0,108	1,1
0,160	2,021	2,159	2,321	2,272	2,193	0,133	1,5
0,080	1,733	1,736	1,729	1,678	1,719	0,027	0,4
0,040	0,964	1,088	1,133	1,100	1,071	0,074	1,7
0,020	0,536	0,569	0,619	0,623	0,587	0,042	1,8
0,010	0,198	0,267	0,291	0,264	0,255	0,040	3,9
0,005	0,224	0,219	0,238	0,212	0,223	0,011	1,2
0,002	0,153	0,152	0,025	0,031	0,152	0,000	0,1

**Tabela 4.4. Repetatibilnost protočne citometrije pri detekciji vezivanja različnih količina RCA<sub>120</sub>-FITC za *L. casei* DG.**

RCA <sub>120</sub> -FITC µg	V1	V2	V3	V4	$\bar{X}$	SD	CV repeat %
0,347	2800	440	3842	3229	2578	1488	14
0,695	3691	6839	4893	969	4098	2456	15
1,39	5299	6882	5860	5872	5978	659	3
2,78	8688	6755	6755	7214	7353	916	3
5,56	1634	12146	15203	13191	10544	6074	14
11,12	24703	29696	41065	23516	29745	8008	7
22,24	34466	39082	31874	25672	32774	5595	4
44,48	31617	35515	28719	25886	30434	4117	3

**Tabela 4.5. Repetatibilnost ELLSA pri detekciji vezivanja različnih količina biotinilovanog RCA<sub>120</sub>-FITC za *L. casei* DG**

RCA <sub>120</sub> -B µg	V1	V2	V3	V4	$\bar{X}$	SD	CV repeat %
11,5	1,663	1,621	1,451	1,499	1,558	0,010	1,6
5,75	1,793	1,617	1,619	1,687	1,679	0,083	1,2
2,875	1,712	1,654	1,702	1,756	1,706	0,042	0,6
1,437	1,554	1,525	1,576	1,512	1,542	0,029	0,5
0,719	1,058	1,258	1,158	1,169	1,161	0,082	1,8
0,360	0,821	0,848	0,888	0,864	0,855	0,028	0,8
0,180	0,473	0,484	0,491	0,492	0,485	0,009	0,5
0,090ž	0,253	0,201	0,217	0,22	0,223	0,022	2,4
0,045	0,145	0,141	0,146	0,156	0,147	0,006	1,1
0,022	0,076	0,069	0,072	0,073	0,072	0,003	1,0
0,011	0,077	0,076	0,078	0,076	0,077	0,001	0,3
0,006	0,064	0,061	0,058	0,061	0,061	0,002	1,0

Najveće vrednosti koeficijenta varijacije ( $CV_{\text{repeat}}$ ), u toku našeg ispitivanja vezivanja BanLec-a za *C. albicans* u ELLSA iznosi 3,9%, dok je koeficijent varijacije vezivanja RCA<sub>120</sub> za *L. casei* DG u ELLSA 2,4%. Vrednosti koeficijenta varijacije dobijene metodom protočne citometrije su daleko veće, tj. do 8% pri vezivanju BanLec-eGFP za *C. albicans* i do 15% pri vezivanju RCA<sub>120</sub> za *L. casei* DG.

Reproducibilnost, se odnosi na merenje jednog istog uzorka istim testom u tri različite laboratorije. Neophodno je odrediti i srednju vrednost SD srednjih vrednosti u različitim laboratorijama. Koeficijent varijacije za reproducibilnost se izračunava na osnovu vrednosti triplikata istog uzorka obrađenog u tri različite laboratorije na Institutu za virusologiju, vakcine i serume "Torlak" (Tabela 4.6), na osnovu formule:

$$CV_{\text{repro}} = \{[(SD(1) + SD(2) + SD(3)) : 3] : [(\bar{A}1 + \bar{A}2 + \bar{A}3) : 3]\} \times 100,$$

SD(X) – je srednja vrednost SD različitih laboratorija,

$\bar{A}$  – je srednji rezultat iz različitih laboratorija.

**Tabela 4.6. Reproducibilnost vezivanja biotinilovanog BanLec-a za različite mikroorganizme.** Eksperiment reproducibilnosti je urađen u tri različite laboratorije, svaki put pripremajući nove mikrotitar ploče.

Nazivi mikroorganizama	LAB1 $\bar{X}$	LAB1 SD	LAB2 $\bar{X}$	LAB2 SD	LAB3 $\bar{X}$	LAB3 SD	CV repro %
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	0,295	0,013	0,232	0,037	0,206	0,017	9,2
<i>L. plantarum</i> WCFS1	1,273	0,017	0,925	0,017	0,987	0,046	2,5
<i>L. rhamnosus</i> LA68	0,653	0,025	0,468	0,001	0,546	0,008	2,1
<i>L. rhamnosus</i> LB64	0,804	0,008	0,611	0,003	1,350	0,081	3,4
<i>L. rhamnosus</i> LGG	0,502	0,014	0,458	0,001	0,540	0,022	2,4
<i>L. helveticus</i> LAFTI	0,780	0,045	0,420	0,004	0,617	0,012	3,4
<i>L. casei</i> DG	0,609	0,030	0,641	0,017	0,624	0,035	4,4
<i>S. agalactiae</i> ATCC 13813	0,729	0,016	0,534	0,027	0,620	0,011	2,9
<i>Streptococcus sp.</i> CI group B	0,815	0,008	0,623	0,022	0,732	0,001	1,4
<i>Streptococcus sp.</i> CI group A	1,338	0,001	1,068	0,011	0,914	0,018	0,9
<i>E. faecalis</i> CI	0,588	0,061	0,564	0,018	1,351	0,017	3,8
<i>S. aureus</i> CI	0,695	0,006	0,528	0,023	0,259	0,014	2,9
<i>P. mirabilis</i> CI	0,594	0,020	0,399	0,029	0,494	0,003	3,5
<i>E. coli</i> CI	0,258	0,007	0,169	0,010	0,419	0,046	7,4
<i>S. enteritidis</i> CI 12	4,021	0,021	4,075	0,091	3,830	0,104	1,8
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	0,846	0,058	0,755	0,037	0,475	0,255	5,8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,43	0,001	0,706	0,054	0,386	0,027	5,4
<i>P. houserii</i> ATCC 13315	0,464	0,005	0,280	0,008	0,203	0,007	2,1
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	0,541	0,030	0,323	0,028	0,202	0,023	7,6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,566	0,030	0,753	0,002	1,102	0,056	3,6
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	3,871	0,022	4,045	0,023	3,939	0,023	0,6

Koeficijent reproducibilnosti ( $CV_{\text{repro}}$ ) za ELLSA, u toku našeg ispitivanja se kretao u opsegu od 0,6 – 9,2%, u zavisnosti od vrste mikroorganizama.

Koeficijenti varijacije dobijeni našim testiranjem ELLSA metode za repetitivnost su niži od 5% i samim tim metoda se smatra visoko preciznom, a s obzirom da ako je koeficijent reproducibilnosti niži od 10% metoda se takođe smatra i visoko reproducibilnom<sup>204, 205</sup>.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovim eksperimentima, gde su vrednosti SD i  $CV_{\text{repeat}}$  dobijene u protočnoj citometriji više, dok je koeficijent determinancije niži, govore u prilog da je ELLSA pouzdanija metoda. Obe metode su rezultovale visokim koeficijentom korelacije što potvrđuje rezultate dobijene ELLSA metodom. Iako su obe metodologije dale jednake rezultate po pitanju registrovanja signala vezivanja, primećene su određene razlike u intenzitetu signala. Ovo može biti posledica tehničkih razlika u izvođenju metode. Glavna razlika je u pripremi mikrotitarskih ploča i bojenju neživih ćelija u ELLSA, u odnosu na protočnu citometriju, gde se obeležavaju živi mikroorganizmi. Procedura zagrevanja i sušenja ćelija mikroorganizama može, teoretski, dovesti do malih izmena dostupnosti polisaharida koji se nalaze na površini mikroorganizama i to može biti odgovorno za razliku u intenzitetu dobijenih signala. Međutim, naši rezultati pokazuju da ne postoji značajna razlika između dve metode, što ukazuje da uglavnom ne postoje drastične promene u površinskim saharidnim strukturama u živim u odnosu na mrtve ćelije mikroorganizama i da generalno ne postoje skriveni epitopi, bar u slučaju specifičnosti dva testirana lektina.

#### 4.4 Međusobno poređenje vezivanja korišćenih lektina za mikroorganizme

Poređenje vezivanja lektina za različite mikroorganizme vršeno je pomoću *Pearson*-ove korelacije, i rezultati su prikazani u Tabeli 4.7. Kako se može videti iz tabele, najveću sličnost u vezivanju za mikroorganizme pokazuju MAA i LCA ( $r=0,91$ ;  $p=0$ ), MAA i SBA ( $r=0,88$ ;  $p=0$ ) i SBA i LCA ( $r=0,86$ ;  $p=0$ ). Značajnu sličnost pokazuju i LCA i ConA ( $r=0,69$ ;  $p=0,001$ ), kao i MAA i SBA sa ConA (oba  $r=0,61$ ;  $p=0,003$  i  $p=0,004$ ). SNA I pokazuje sličnost u vezivanju sa ConA ( $r=0,68$ ;  $p=0,001$ ), LCA ( $r=0,53$ ;  $p=0,014$ ), dok je korelacija SNA I sa SBA nešto niža, ali opet značajna ( $r=0,47$ ;  $p=0,032$ ). Značajna sličnost pronađena je i između WGA i SBA ( $r=0,54$ ;  $p=0,012$ ), kao i WGA i LCA ( $r=0,50$ ;  $p=0,021$ ). BanLec i RCA<sub>120</sub> ne pokazuju značajnu sličnost sa ostalim testiranim lektinima, što odgovara prethodno dobijenim rezultatima i tvrdnji da BanLec prepoznaje površinske manozne strukture *C.albicans* ali i  $\beta$ -glukan koji generalno nije prisutan na bakterijama, dok RCA<sub>120</sub> specifično vezuje galaktozu na površini *L. casei* DG.

Najverovatniji razlog najvećeg stepena sličnosti u vezivanju koji su pokazali MAA i LCA je usled njihovog afiniteta za glukozu, dok je kod MAA i SBA to galaktoza, mada je najupečatljivije ono što povezuje ove lektine, baš kao i SBA i LCA a to je njihovo vezivanje za *L.helveticus* LAFTI i *L. acidophilus* ViVag, koje zapravo dosta utiče na dobijene vrednosti. ConA kao lektin sa širokim spektrom afiniteta pokazuje značajnu sličnost sa ostalim lektinima, sa LCA usled specifičnosti vezivanja manoze, dok sa MAA, SBA to opet može biti posledica prisustva specifičnih glikana na površini *L.helveticus* LAFTI i *L. acidophilus* ViVag.

SNA I i SBA pokazuju značajnu sličnost usled obostranog afiniteta prema površinskim galaktoznim i N-acetilgalaktozaminskim reziduama. Sličnost između WGA i SBA može poticati od obostranog afiniteta prema reziduama N-acetilgalaktozamina. Značajna sličnost

između WGA i LCA je posledica njihovog vezivanja za većinu mikroorganizama u studiji, što govori o tome da dosta njih na svojoj površini ekspirira kombinaciju manoze, glukoze, N-acetilglukoze, N-acetilgalaktoze.

**Tabela 4.7. Međusobno poređenje vezivanja korišćenih lektina za različite mikroorganizme, na istim razblaženjima kao što je prikazano na slici 4.4.**

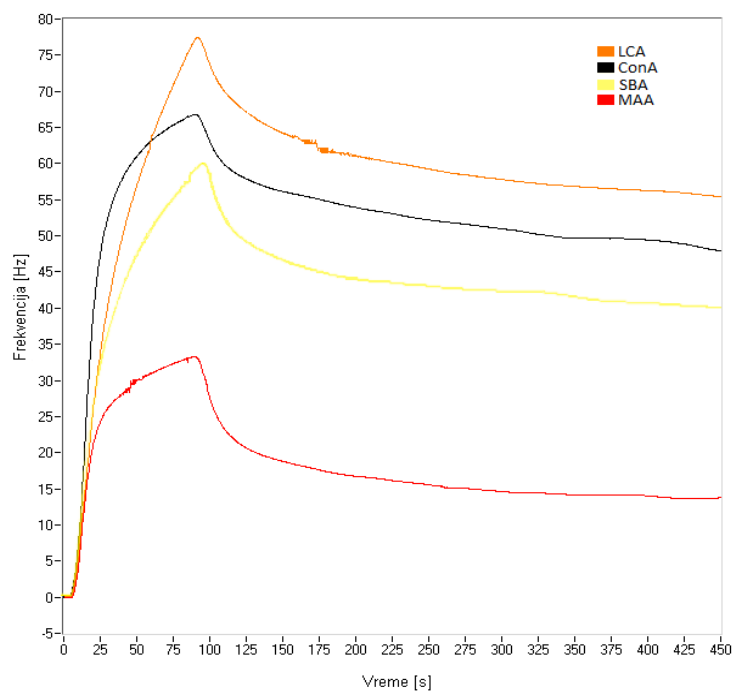
r	MAA	RCA120	WGA	SBA	LCA	Con A	SNA I
BanLec	0	-0,11	-0,17	-0,09	0,02	-0,06	-0,05
MAA		0,20	0,28	0,88	0,91	0,61	0,53
RCA <sub>120</sub>			0,24	0,32	0,18	0,07	0,04
WGA				0,54	0,50	0,35	0,24
SBA					0,86	0,61	0,47
LCA						0,69	0,53
Con A							0,68
SNA I							

p	MAA	RCA120	WGA	SBA	LCA	Con A	SNA I
BanLec	0,996	0,640	0,459	0,709	0,916	0,809	0,837
MAA		0,395	0,217	0,000	0,000	0,003	0,014
RCA <sub>120</sub>			0,304	0,159	0,430	0,768	0,877
WGA				0,012	0,021	0,120	0,296
SBA					0,000	0,004	0,032
LCA						0,001	0,014
Con A							0,001
SNA I							

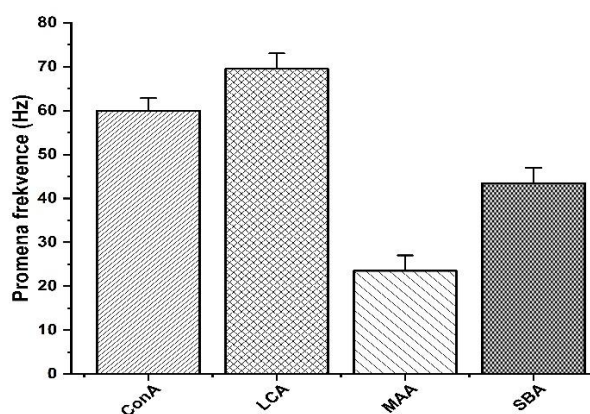
#### 4.5 Ispitivanje interakcija lektina sa površinskim bakterijskim saharidima pomoću QCM tehnologije

QCM tehnologija korišćena u ovoj studiji zasniva se na kuplovanju QCM senzorske pločice sa adekvatnim receptorom, u ovom slučaju to je bio biljni lektin ConA. Zatim je za lektin vezana i imobilisana bakterija *L. helveticus*, za koju je prethodno pokazano da se vezuje za Con A, čime se formirao jedinstveni bakterijski sloj na površini. QCM bakterijski čip omogućio je procenu kinetike vezivanja lektina za imobilisane bakterije propuštanjem četiri različita lektina preko čipa: MAA, LCA, SBA i ConA i analiziranjem promena frekvencije kvarcnog kristala usled interakcija (Slika 4.19).



**Slika 4.19.** Kinetika vezivanja lektina za *L. helveticus* LAFTI

Nakon propuštanja svakog od lektina pojedinačno kroz sistem izvršena je regeneracija rastvorom niske pH vrednosti kako bi se oslobodila mesta vezivanja na bakterijama za testiranje narednog lektina. Očitana je frekvencija maksimalnog vezivanja svakog od lektina (**Slika 4.20**) i određena je konstanta brzine disocijacije ( $k_{off}$ ). Upravo je  $k_{off}$  korišćen kao parametar praćenja kinetike ovih interakcija, s obzirom da daje precizne podatke i ne zavisi od koncentracije. Kinetički eksperimenti su izvršeni za svaki uzorak u duplikatu (**Tabela 4.8**). Rezultati vezivanja lektina za bakterijski čip prikazani su na **Slici 4.20**.



**Slika 4.20.** Vezivanje lektina za bakterijski čip *L. helveticus* LAFTI

Promene intenziteta frekvencije u slučaju vezivanja ispitivanih lektina je slično ili veće od intenziteta prijavljenih u literaturi za vezivanje lektina za čip za koji su direktno vezani

saharidni ostatci<sup>206</sup>, što ukazuje na visoku uspešnost imobilizacije bakterija. Vezivanje istog lektina za imobilizovane bakterije na čipu je reproducibilno, sa istim odgovorom, u intervalu greške od 4 do 15%. Detektovane promene intenziteta frekvencije su u dobroj korelaciji sa rezultatima dobijenim u ELLSA eseju (**Slika 4.4**), osim blagog odstupanja u slučaju nešto povećanog kapaciteta za vezivanje LCA. S obzirom da je LCA 2 do 4 puta manji protein nego ostali korišćeni lektini, on potencijalno može da se veže i za sterno donekle zaštićena vezivna mesta na čipu. Očekivano je da sterni efekti više doprinose u slučaju ispitivanja vezivanja na QCM čipovima u odnosu na bunare mikrotitarskih ploča koji se koriste pri izvođenju ELLSA eseja, budući da je višestruko veći odnos aktivne površine na kojoj se vezivanje odvija u odnosu na zapreminu same komore. Takođe, u ovom eksperimentu bakterije su hemijski fiksirane, što dodatno doprinosi sternoj zaštiti vezivnih mesta na njihovoj površini.

**Tabela 4.8. Određivanje konstante brzine disocijacije pri vezivanju ConA, LCA, MAA i SBA za *L. helveticus* LAFTI**

Lektini	<i>L. helveticus</i> LAFTI			
	k1 <sub>off</sub>	k2 <sub>off</sub>	k <sub>off</sub>	SD
Con A	7,11 x 10 <sup>-4</sup>	5,10 x 10 <sup>-4</sup>	6,11 x 10 <sup>-4</sup>	1,42 x 10 <sup>-4</sup>
LCA	8,69 x 10 <sup>-4</sup>	4,71 x 10 <sup>-4</sup>	6,70 x 10 <sup>-4</sup>	2,81 x 10 <sup>-4</sup>
MAA	19,10 x 10 <sup>-4</sup>	10,80 x 10 <sup>-4</sup>	14,95 x 10 <sup>-4</sup>	5,87 x 10 <sup>-4</sup>
SBA	7,92 x 10 <sup>-4</sup>	8,80 x 10 <sup>-4</sup>	8,36 x 10 <sup>-4</sup>	0,62 x 10 <sup>-4</sup>

Svi testirani lektini su pokazali niske vrednosti afiniteta što je bilo za očekivati s obzirom na prirodu interakcija između lektina i saharida. Vrednost konstante brzine disocijacije najniža je pri vezivanju ConA za *L. helveticus* LAFTI, što ukazuje da je u tom paru najveći afinitet, dok je afinitet vezivanja ostalih lektina nešto niži, što je u potpunosti u skladu sa rezultatima dobijenim ELLSA.

#### 4.6 Poređenje vezivanja serumskih imunoglobulina (IgG i IgA klasa) sa vezivanjem lektina za mikroorganizme

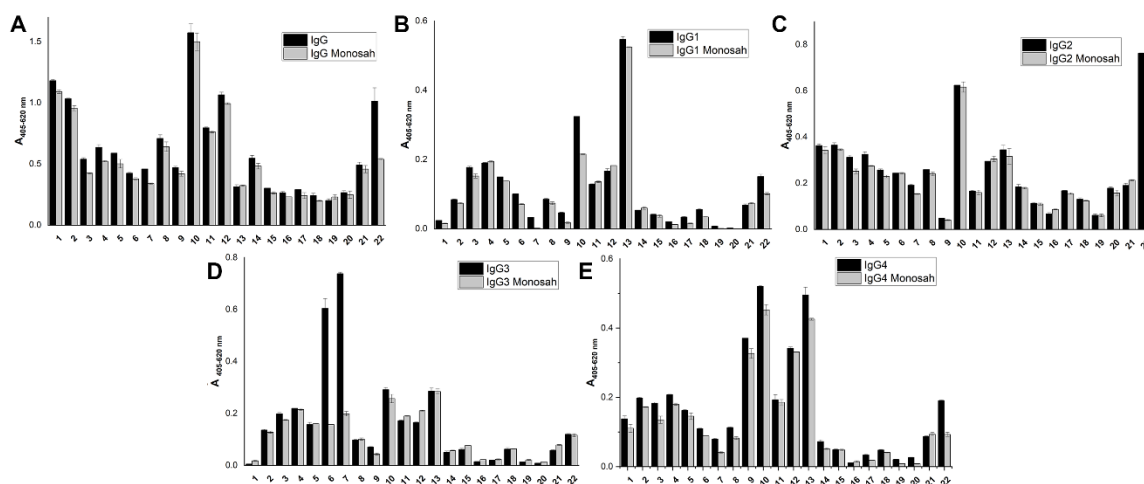
Kako površinske glikanske strukture na mikroorganizmima, osim mogućnosti vezivanja lektina predstavljaju i antigenske determinante, za koje je moguće, kao i poželjno vezivanje antitela, drugi deo ove teze ima za cilj da se ustanove relacije između vezivanja lektina i vezivanja antitela za mikroorganizme.

U te svrhe korišćeni su isti mikroorganizmi i tehnika opisana u Minić R. et al. 2018. godine, koja je u osnovi ELISA koja je rađena kao i ELLSA, sa „celim“ mikroorganizmima adsorbovanim za plastiku<sup>175</sup>. Zbog nemogućnosti izvođenja veoma velikog broja analiza u ove svrhe, kao i zbog očekivanja individualnih razlika među ispitanicima, kao uzorak seruma korišćen je zbirni serumski uzorak dobijen od 14, mladih zdravih osoba prosečne starosti 19–26 god. Analizirana je reaktivnost ukupnog serumskog IgG-a prema bakterijama, reaktivnost pojedinačnih IgG potklasa, zatim serumskog IgA i serumskih IgA potklasa. Ispitivana je i inhibicija vezivanja serumskih antitela pomoću mešavine tri prethodno korišćena monosaharida (glukoze, manoze i galaktoze).

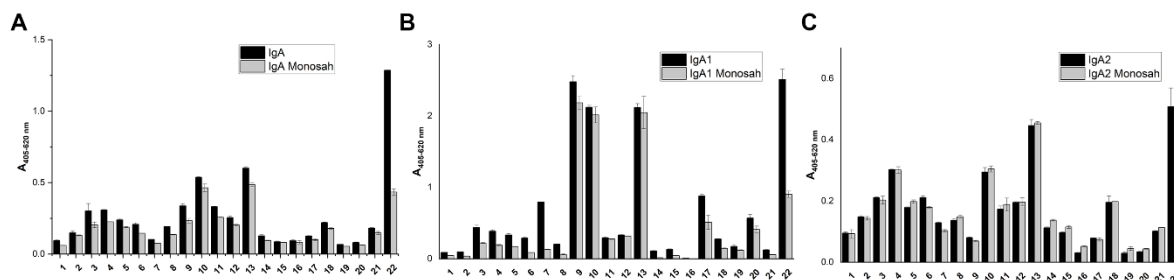
Kada se pomoću gore navedenog pristupa međusobno poredi vezivanje ukupnog IgG za ostalim IgG potklasama dobija se najveća pozitivna korelacija ukupnog IgG sa IgG2 ( $r=0,76$ ,  $p=0,002$ ), što je u saglasnosti sa literaturnim podacima.

Dobijeni rezultati su prikazani na **Slici 4.21 i 4.22**. Uopšteno, može se primetiti slabiji intenzitet vezivanja za Gram negativne bakterije, što važi skoro za sve potklase IgG i IgA, i što može biti posledica tehničkih karakteristika ove metode, gde se primećuje veća otpornost Gram pozitivnih mikroorganizama kao i gljiva prema koracima pripreme ploča i kasnijeg izvođenja testa. Na **Slici 4.21 i 4.22** može se videti i da je uticaj inhibicije monosaharidima na vezivanje serumskih antitela za mikroorganizme vrlo diskretan, sem u određenim slučajevima, od kojih je najupečatljivija inhibicija vezivanja serumskih antitela, gotovo svih podklasa IgG (**Slika 4.21A, C, E**) i obe IgA potklase za *C. albicans* **Slika 4.22**. Takođe primećuje se i inhibicija vezivanja IgG3 za *L. helveticus* LAFTI i *L. acidophilus* ViVag, što predstavlja niskoafinitetnu interakciju u ovom slučaju.

Na osnovu odsustva snažnije inhibicije vezivanja serumskih imunoglobulina u prisustvu visokih koncentracija monosaharida se može zaključiti ili da je afinitet antitela prema glikanima mikroorganizama vrlo visok, ili da je veći od afiniteta vezivanja korišćenih monosaharida, ili da se antitela vezuju za proteinske ili lipidne antigene.



**Slika 4.21. Vezivanje zbirnog uzorka serumskih imunoglobulina dobijenih iz mladih zdravih osoba za različite mikroorganizme u ELISA-i. Za određivanje IgG klase i IgG potklasa zbirni uzorak seruma razblaživan je 400x. A) IgG; B) IgG1; C) IgG2; D) IgG3; E) IgG4. Uzorci su rađeni u duplikatu: 1. *L. reuteri* DSM, 2. *L. plantarum* WCFS1, 3. *L. rhamnosus* LA68, 4. *L. rhamnosus* LB64, 5. *L. rhamnosus* LGG, 6. *L. helveticus* LAFTI, 7. *L. acidophilus* ViVag, 8. *L. reuteri* DG, 9. *S. pneumoniae*, 10. *S. pyogenes*, 11. *S. agalactiae*, 12. *Streptococcus* type B, 13. *Streptococcus* type A, 14. *E. fecalis*, 15. *P. mirabilis*, 16. *S. Typhimurium*, 17. 18. *K. pneumoniae*, 19. *P. aeruginosa*, 20. *P. houserii*, 21. *S. flexneri*, 22. *E. coli*, 23. *C. albicans*. Crni stubići bez dodatka monosaharida u razblaženje seruma, sivi stubići sa dodatkom monosaharida u razblaženje seruma (inhibicija). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.**



**Slika 4.22. Vezivanje zbirnog uzorka serumskih imunoglobulina dobijenih iz mladih zdravih osoba za različite mikroorganizme u ELISA-i.** Za određivanje IgA klase i IgA potklasa zbirni uzorak seruma razblaživan je 100x A) IgA; B) IgA1; C) IgA2. Uzorci su rađeni u duplikatu: 1. *L. reuteri* DSM, 2. *L. plantarum* WCFS1, 3. *L. rhamnosus* LA68, 4. *L. rhamnosus* LB64, 5. *L. rhamnosus* LGG, 6. *L. helveticus* LAFTI, 7. *L. acidophilus* ViVag, 8. *L. reuteri* DG, 9. *S. pneumoniae*, 10. *S. pyogenes*, 11. *S. agalactiae*, 12. *Streptococcus* type B, 13. *Streptococcus* type A, 14. *E. fecalis*, 15. *P. mirabilis*, 16. *S. Typhimurium*, 17. 18. *K. pneumoniae*, 19. *P. aeruginosa*, 20. *P. houseri*, 21. *S. flexneri*, 22. *E. coli*, 23. *C. albicans*. Crni stubici bez dodatka monosaharida u razblaženje seruma, sivi stubici sa dodatkom monosaharida u razblaženje seruma (inhibicija). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.

Prikazani rezultati predstavljaju rezultat ukupnog vezivanja serumskih antitela pri velikim razblaženjima, kao i sekundarnih antitela i streptavidin-alkalne fosfataze, jer u ovom slučaju nije oduziman signala, za svaki pojedinačni mikroorganizam, već je oduziman signal zajedničke slepe probe, te se prikazani rezultati vezivanja antitela za mikroorganizme ne mogu koristiti za međusobno poređenje reaktivnosti serumskih antitela prema različitim mikroorganizmima. Dobijeni rezultati vezivanja antitela za mikroorganizme korišćeni su, u ovom slučaju za poređenje stepena interakcije različitih klasa i potklasa serumskih antitela sa stepenom interakcije korišćenih lektina, što je prikazano u **Tabeli 4.9**. Poređenje je vršeno Personovom korelacijom i prikazani su i Personov korelacioni koeficijent  $r$  i dobijena verovatnoća  $p$ .

**Tabela 4.9. Poređenje stepena interakcije različitih klasa i potklasa antitela sa stepenom interakcije korišćenih lektina**

$r$	IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgA1	IgA2
BanLec	0,10	0,04	0,43	0,04	0,00	0,64	0,43	0,42
MAA	-0,03	0,18	0,03	0,96	0,17	-0,01	0,11	0,20
RCA120	0,15	0,15	0,08	0,21	0,15	-0,01	-0,05	0,09
WGA	0,30	0,33	0,23	0,31	0,41	-0,07	0,08	0,14
SBA	0,27	0,23	0,21	0,86	0,35	-0,03	0,10	0,19
LCA	0,17	0,38	0,21	0,89	0,42	0,15	0,28	0,38
Con A	0,22	0,53	0,23	0,63	0,55	0,13	0,42	0,34
SNA I	0,04	0,14	-0,03	0,57	0,14	-0,01	0,03	0,16

**Tabela 4.9. Nastavak**

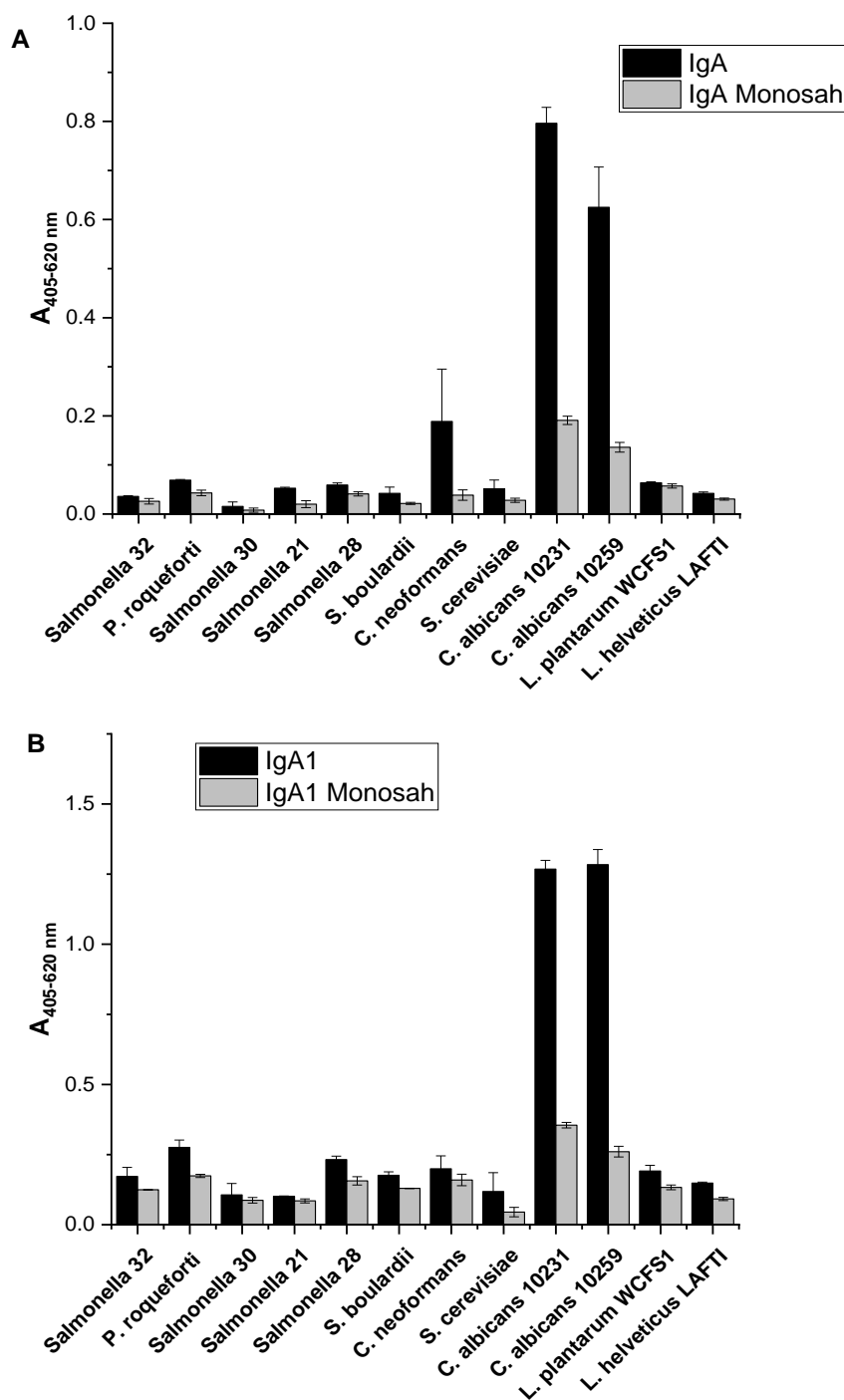
<i>p</i>	IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgA1	IgA2
BanLec	0,660	0,852	0,055	0,864	0,991	<b>0,002</b>	<b>0,049</b>	0,057
MAA	0,901	0,442	0,892	0,000	0,471	0,968	0,632	0,381
RCA120	0,524	0,528	0,746	0,362	0,526	0,959	0,836	0,707
WGA	0,183	0,146	0,325	0,176	0,062	0,765	0,742	0,560
SBA	0,235	0,327	0,365	0,000	0,123	0,903	0,668	0,407
LCA	0,450	0,091	0,36	0,000	0,057	0,518	0,212	0,092
Con A	0,347	<b>0,014</b>	0,31	<b>0,002</b>	<b>0,010</b>	0,582	0,058	0,135
SNA I	0,866	0,548	0,913	<b>0,007</b>	0,559	0,962	0,899	0,479

Kada se radi o sličnosti u vezivanju između lektina i serumskih IgG i IgA potklasa za mikroorganizme primećuje se nekoliko statistički značajnih sličnosti, što se može videti iz **Tabele 4.9**. Iz dobijenih rezultata se vidi da IgG3 potklasa pokazuje sličnost sa vezivanjem većeg broja lektina i to prvenstveno sa MAA ( $r=0,96$ ), zatim LCA ( $r=0,89$ ), SBA ( $r=0,86$ ), ConA ( $r=0,63$ ) i SNA I ( $r=0,57$ ). Interesantan podatak vezan za ovu potklasu antitela je da ona gotovo nikad nisu samostalni nosilac imunskog odgovora<sup>207</sup>, da se, zajedno sa IgG1 prva pojavljuju tokom virusnih infekcija<sup>208</sup> i da se, što je najrelevantnije za ovde prikazane rezultate, upravo ova potklasa antitela (pored IgM-a) javlja kao specifična za gliko-sfingo-lipidne antigene krvnih grupa<sup>209</sup>.

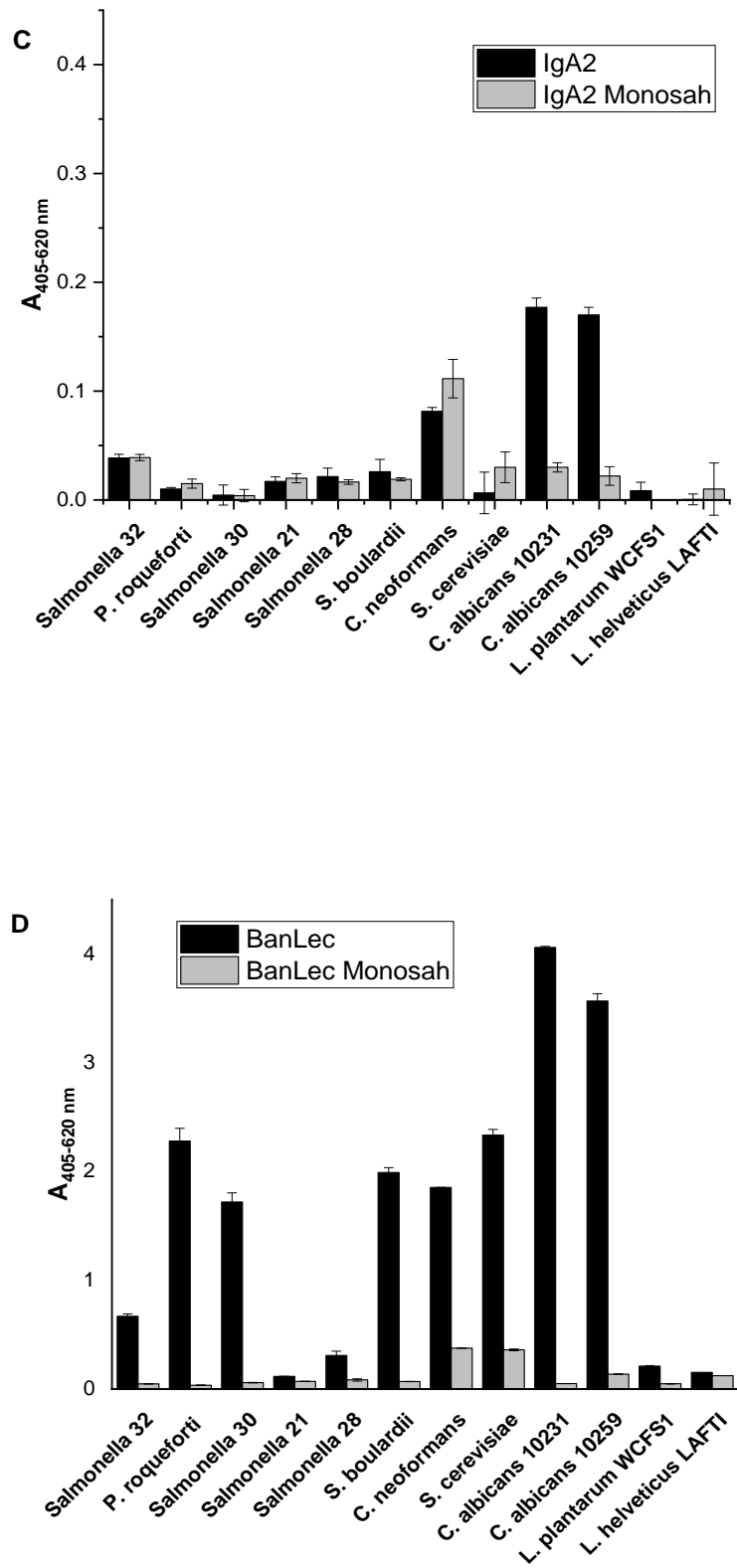
Vezivanje IgG1 i IgG4 potklase pokazuje značajnu sličnost sa vezivanjem ConA ( $r=0,53$  i  $r=0,55$ , redom), s tim što se za razliku od vezivanja IgG3 ove interakcije uglavnom ne mogu inhibirati monosaharidima.

Iz dobijenih rezultata se vidi da od testiranih lektina jedino BanLec pokazuje sličnost sa vezivanjem ukupnih antitela IgA klase, pre svega sa vezivanjem IgA1 potklase. Kako je BanLec najtemeljnije analizirani lektin u ovom radu, da bi se potvrdila sličnost u vezivanju, tj. postojanje zajedničke specifičnosti BanLec-a sa vezivanjem serumskog IgA, ELISA/ELLSA je ponovljena na uzorku mikroorganizama za koje je pretpostavljeno da će vezivati i BanLec i IgA, tačnije na izabranim vrstama gljiva i *Salmonella* serotipovima.

Logično je pretpostaviti da se poliklonski, serumski IgA sastoji od više različitih specifičnosti. Na **Slici 4.23** A, B i C prikazani su rezultati vezivanja IgA za mikroorganizme, iz kojih se vidi da je u ovoj populaciji najizraženija specifičnost poliklonskog, serumskog IgA prema *C. albicans*. Drugim rečima iz dobijenog rezultata proizilazi da bi vezivanje  $\beta$ -glukana mogla biti dominantna specifičnost serumskog IgA, dok afinitet za vezivanje manoznih struktura, prisutanih na *Salmonella* serotipovima nije izražen. Takođe je interesantno da je vezivanje serumskog IgA za mikroorganizme moguće u velikoj meri inhibirati kombinacijom monosaharida, na sličan način na koji se inhibira i vezivanje BanLec-a. Vezivanje, salivarnog IgA za dekstrane opisano je u literaturi, gde se takođe pominje da je vezivanje određenih struktura mikroorganizama određeno ili antitelima potklase IgA1 ili IgA2, dok su naši rezultati u ovom slučaju pokazali preklapanje između ove dve potklase<sup>210</sup>. Međutim iako  $\beta$ -glukani postoje i na drugim vrstama kvasaca, serumski IgA nije pokazao vezivanje za *S. cerevisiae* ni *S. boulardii*, kao i da dekstrani poseduju  $\alpha$ -1,6 glikozidnu vezu, što ostaje da se objasni.



**Slika 4.23. Vezivanje poliklonskog serumskog IgA i BanLec-a za različite mikroorganizme u ELISA-i.** Za određivanje IgA klase i IgA potklasa zbirni uzorak seruma razblaživan je 100x A) IgA; B) IgA1; C) IgA2; D) BanLec. Uzorci su rađeni u duplikatu. Tamni stubici bez dodatka monosaharida u razblaženje seruma, svetli stubići sa dodatkom monosaharida u razblaženje seruma i lektina (inhibicija). Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama.



Slika 4.23. Nastavak

**Tabela 4.10. Poređenje stepena interakcije ukupnog IgA i njegovih potklasa IgA1 i IgA2 sa BanLec**

<i>r</i>	IgA	IgA1	IgA2	BanLec
IgA		0.98	0.97	0.78
IgA1	0.98		0.94	0.77
IgA2	0.97	0.94		0.76
BanLec	0.78	0.77	0.76	

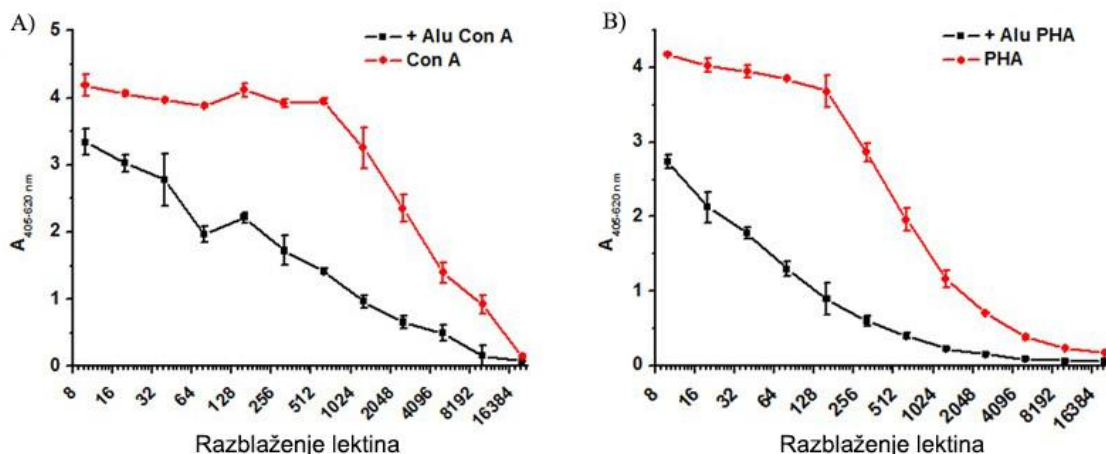
<i>p</i>	IgA	IgA1	IgA2	BanLec
IgA		0.000	0.000	0.003
IgA1	0.000		0.000	0.003
IgA2	0.000	0.000		0.004
BanLec	0.003	0.003	0.004	

Iako je ovakav pristup u određivanju specifičnosti antitela može biti interesantan, pogotovu što je interakcija IgA sa *C. albicans* u velikoj meri inhibirana monosaharidima, postavlja se pitanje zašto se serumski IgA ne vezuje za ostale ispitivane kvasce, koji takođe sadrže  $\beta$ -glukan. Te dobijeni rezultat, bez obzira na statističku značajnost, ipak u ovom slučaju može biti posledica slučajnosti, i afinitet serumskog IgA može biti određen vezivanjem sa specifične antigene determinante *C. albicans*.

#### 4.7 Ispitivanje glikozilacije virusnih vakcina

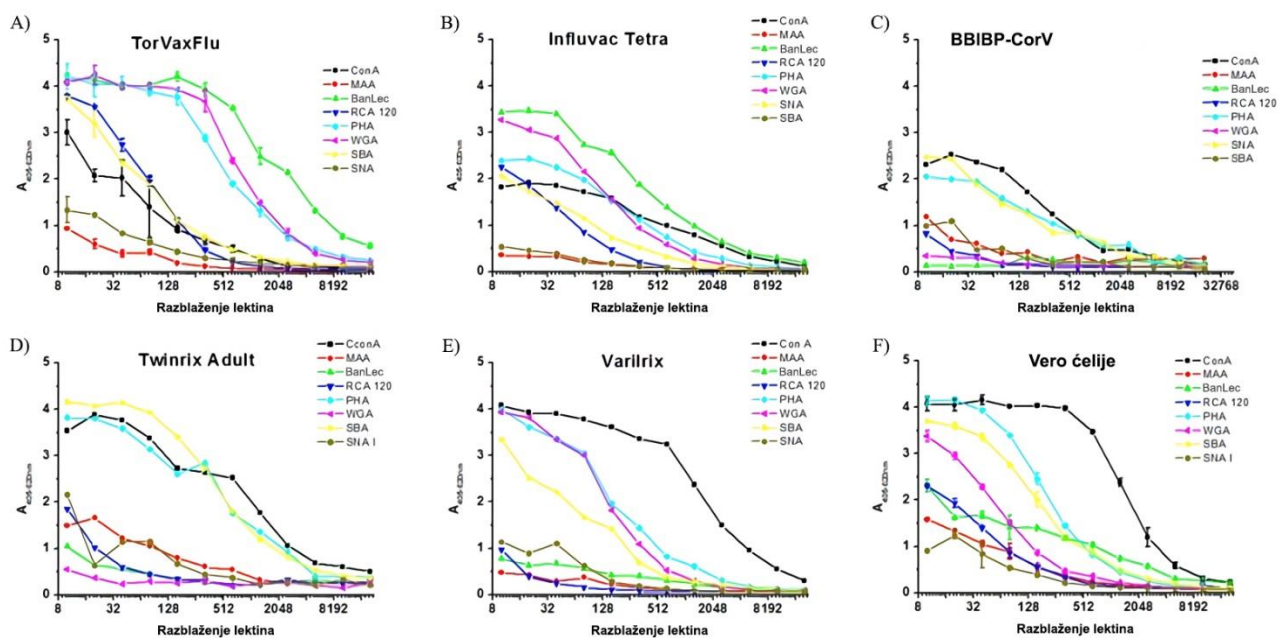
U sklopu ispitivanja površinske glikozilacije mikroorganizama vršeno je i ispitivanje vezivanja lektina za različite viruse, prisutne u vakcinama za humanu upotrebu. Ispitivanje je rađeno ELLSA, pomoću adsorpcije vakcina na mikrotitarsku ploču i vezivanja biotinirovanih lektina. Ispitano je 5 virusnih vakcina i to: Varilix (GlaxoSmithKline), vakcina protiv varičele; Twinrix Adult (GlaxoSmithKline), vakcina protiv hepatitisa A i hepatitisa B; BBIBP-CorV (Sinopharm) vakcina protiv SARS-CoV-2 virusa; TorVaxFlu (Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“) i Inlufac Tetra (Abbott Biologicals) vakcine protiv virusa *Influenze*. Kao doza vakcine neophodna za procenu virusne glikozilacije, korišćena je jedna humana doza u svakoj ELLSA. Paralelno je testirano i vezivanje lektina za VERO ćelije, jer je to ćelijska linija koja je korišćena za proizvodnju BBIBP-CorV vakcine.

Uticaj aluminijumskih adjuvanasa na ovaj test ispitan je tako što je Varilixu dodat aluminijum fosfatni gel u odgovarajućoj koncentraciji i paralelno je postavljen test na Varilix sa i bez aluminijuma sa dva različita lektina. Dodatak aluminijumskih adjuvanasa smanjuje intenzitet signala u ovom testu. Razlog može biti da dodatak adjuvanasa ili smanjuje vezivanje virusa za ploču, ili vezivanje lektina za virus. U svakom slučaju, iako dolazi do smanjenja intenziteta signala u prisustvu adjuvanasa, zavisnost intenziteta signala od količine dodatog lektina je registrovana, a uticaj aluminijuma je približno istog intenziteta na oba testirana lektina **Slika 4.24**.



**Slika 4.24. Titracije lektina za Varilix:** A) Titracija vezivanja biotinilovanog Con A za Varilix sa ELLSA; B) Titracija vezivanja biotinilovanog PHA za Varilix sa ELLSA. Varilix – crvena linija; Varilix prethodno inkubiran sa aluminijum fosfatom – crna linija.

Rezultati vezivanja različitih lektina za virusne vakcine prikazani su na **Slici 4.24**. Lektini ConA, SNAI i PHA najviše su se vezivali za Varilix, Twinrix Adult, BBIBP-CorV kao i za VERO ćelije. Izgled kriva vezivanja lektina za TorVaxFlu i Influvac Tetra protiv virusa *Influenze* je bio drugačiji, najviše se vezivao BanLec, WGA i PHA **Slika 4.25**.



**Slika 4.25. Titracija vezivanja biotinilovanih lektina za različite vakcine i Vero ćelije sa ELLSA;** A) TorvaxFlu; B) Influvac Tetra; C) BBIBP-CorV; D) Twinrix; E) Varilix; F) Vero ćelija. Con A crni kvadrat; MAA – crveni krug; BanLec – zeleni trougao; RCA<sub>120</sub> plavi trougao; PHA tirkizni romboid; WGA ljubičasti trougao, SBA žuti trougao; SNA I zeleni krug. Svaka analiza je izvedena sa jednom ljudskom dozom po ploči.

Da bi poredili sličnost u vezivanju lektina korišćena je korelacija dobijenih vednosti i dobijene vrednosti koeficijenta korelacije prikazane su u **Tabela 4.11**.

Koristeći ovu jednostavnu metodologiju, izveden je zaključak da tip glikozilacije u virusnim vakcinama u velikoj meri zavisi od tipa ćelije u kojoj se proizvode virusi, pa stoga vakcine protiv gripa, koje se proizvode u kokošijim jajima, imaju značajno različite obrasce glikozilacije u poređenju sa drugim analiziranim vakcinama, koje međusobno pokazuju veliku sličnost u glikozilaciji **Tabela 4.11**.

**Tabela 4.11 Međusobna korelacija vezivanja lektina za različite virusne vakcine.** Broj tačaka koji je koreliran iznosio je 8, prema broju korišćenih lektinskih molekula, a korišćeno je razblaženje od 40x.

<b>Pearson r</b>	TorVaxFlu	BBIBP-CorV	Twinrix Adult	Varilix	VERO cell	Influvac Tetra
TorVaxFlu		0,44	0,37	0,46	<b>0,69</b>	<b>0,93</b>
BBIBP-CorV	0,44		<b>0,68</b>	<b>0,84</b>	<b>0,80</b>	0,28
Twinrix Adult	0,37	<b>0,68</b>		0,49	<b>0,80</b>	0,15
Varilix	0,46	<b>0,84</b>	0,49		<b>0,81</b>	0,41
VERO cell	<b>0,69</b>	<b>0,80</b>	<b>0,80</b>	<b>0,81</b>		0,53
Influvac Tetra	<b>0,93</b>	0,28	0,15	0,41	0,53	
<b>Probability</b>	rToVaxFlu	BBIBP-CorV	Twinrix Adult	Varilix	VERO cell	Influvac Tetra
TorVaxFlu		0,27	0,36	0,25	<b>0,06</b>	<b>0,00</b>
BBIBP-CorV	0,27		<b>0,06</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	0,51
Twinrix	0,36	<b>0,06</b>		<b>0,22</b>	<b>0,02</b>	0,72
Varilix	0,25	<b>0,01</b>	0,22		<b>0,02</b>	0,32
VERO	<b>0,06</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>		0,17
influvac tetra	<b>0,00</b>	0,51	0,72	0,32	0,17	

Pa tako dve vakcine protiv Influenza virusa proizvedene od strane različitih proizvođača, na kokošijim jajima daju koeficijent korelacije 0,93, što ukazuje na veliku sličnost u glikozilaciji. S obzirom na to da virusi uglavnom preuzimaju sintetsku mašineriju ćelija domaćina ovakav rezultat nije neočekivan. Ovo je veoma važan nalaz, uglavnom zbog velike sličnosti glikozilacije u proizvodnim ćelijskim linijama sa glikozilacijom koja se nalazi kod ljudi. Takođe, ova činjenica bi, u teoriji, mogla imati veliki uticaj na efikasnost virusnih vakcina, posebno inaktivisanih vakcina na bazi celih virionskih čestica proizvedenih za izrazito glikozilovane viruse. Što se tiče validnosti ovog rezultata, treba imati u vidu da je korišćeno 8 lektina za tipizaciju glikozilacije, te je korelacija vršena sa 8 eksperimentalnih tačaka. Način da se poveća značaj ovog rezultata bila bi upotreba dodatnih lektina sa različitim specifičnostima.

## 5. ZAKLJUČCI

Izrada ove doktorske disertacije dovela je do uspostavljanja i validiranja ELLSA metode, koja služi za određivanje interakcije između saharidnih struktura i lektina u mikrotitarskim pločama, a na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. ELLSA se može koristiti sa velikom pouzdanošću za određivanje prisustva određenih saharida na površini mikroorganizama.
2. Mikroorganizmi predstavljaju lako dostupan i reproducibilan izvor saharidnih struktura, drugim rečima, mikroorganizmi mogu služiti kao samoobnavljajući izvor glikanskih proba.
3. Identifikovani su specifični mikroorganizmi koji se mogu koristiti kao stabilan izvor  $\beta$ -glukana, manoze i galaktoze, drugim rečima kao standardi.
4. ELLSA metoda sa ukupnim mikroorganizmima se može koristiti za međusobno poređenje specifičnosti različitih lektina. Što se lektinskih vrsta korišćenih u ovom radu tiče, određeni lektini pokazali su veliku međusobnu sličnost u vezivanju za mikroorganizme i dok je to za neke lektine bilo očekivano, kao što su na primer LCA i ConA, sličnost u vezivanju SBA sa LCA nije očekivana i može biti posledica izabrane grupe mikroorganizama. Naime, lektini SBA i LCA, iako potpuno drugačijeg afiniteta, pokazali su visok nivo korelacije prilikom vezivanja za površinske glikane naročito zbog intenzivnog vezivanja za *L.helveticus* LAFTI i *L. acidophilus* ViVag. Konkretno izbor dve bakterijske vrste koje na svojoj površini, izgleda, imaju više različitih saharida teoretski je mogao proizvesti ovakav rezultat. Sličnost je registrovana u signalima dobijenim i prilikom vezivanja WGA i LCA za testirane mikroorganizme, a razlog tome je najverovatnije širok spektar specifičnosti ovih lektina, i/ili istovremeno prisustvo istih saharidnih struktura na različitim mikroorganizmima. N-acetilglukozamin koji vezuje WGA nalazi se na ćelijskom zidu Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija.
5. Značajna sličnost u reaktivnosti koju su pokazali različiti lektini predstavlja ograničavajući faktor za upotrebu lektina u analitičke i dijagnostičke svrhe.
6. Specifičnosti BanLec-a i RCA<sub>120</sub> nisu značajno korelirale sa ostalim ispitivanim lektinima, pa se za njih može reći da imaju unikatnu specifičnost, barem u okviru metodologije prikazane u ovom radu.
7. Prilikom poređenja ELLSA sa protočnom citometrijom ustanovljeno je da se prednosti ELLSA u odnosu na protočnu citometriju sastoje od veće preciznosti i upotrebe značajno manjih količina reagenasa.
8. Pored podataka o specifičnosti vezivanja lektina za površinske glikane mikroorganizama dobijenih ELLSA, detaljnije informacije o kinetici vezivanja lektina za cele mikroorganizme moguće je dobiti bez korišćenja obeleživača, korišćenjem QCM bakterijskih čipova.

9. QCM metoda nam je potvrdila rezultate dobijene ELLSA i potvrdila literaturne podatke o niskom afinitetu lektinskih interakcija, te su se sve ispitivane interakcije kretale u opsegu od  $10^{-5}$  do  $10^{-3}$ , čak i sa repetitivnim strukturama koje se nalaze na bakterijskim ćelijama.
10. Pored toga, QCM analiza nam je pružila mogućnost testiranja različitih lektina prema jednoj bakterijskoj kulturi koja se nalazi na QCM senzor čipu, a samim tim i prema identičnom broju bakterijskih ćelija. Jedna od mogućnosti koje pruža QCM tehnologija pored kinetike vezivanja je registrovanje broja vezujućih mesta koje je zavisno od glikozilacije i upravo to može biti od izuzetne važnosti prilikom ispitivanja „wild type“ mikroorganizama i mutiranih sojeva.
11. Kada se uporedno koriste, obe metode omogućavaju temeljno ispitivanje površinskih glikana mikroorganizama, ali i receptora domaćina koji vezuju te glikane. ELLSA pruža mogućnost analiziranja velikog broja lektina i mikroorganizama, dok QCM pruža uvid u kinetiku interakcija između lektina i mikroorganizama.
12. Uporeda analiza vezivanja lektina i serumskih antitela pokazala je da su serumska antitela, koja se vezuju za mikroorganizme, mahom znatno većeg afiniteta od lektinskih molekula, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima.
13. Praktični smisao testiranja površinske glikozilacije mikroorganizama različitim lektinima potvrđen je rezultatom koji je dobijen testiranjem i međusobnim poređenjem glikozilacije virusnih vakcina. Ustanovljeno je da, kako virus preuzima sintetsku mašineriju domaćina, tako je i njegova površinska glikozilacija direktno zavisna od te sintetske mašinerije domaćina, pa se na osnovu glikanskih struktura ne može razlikovati od sopstvenih struktura, što virusima pruža svojevrsan vid zaštite, a može predstavljati i problem pri dizajniranju efikasnih virusnih vakcina.

Na kraju, može se zaključiti da iako su lektinske interakcije niskog afiniteta, i postoje preklapanja u specifičnostima različitih lektina, pažljivim odabirom kombinacija lektina i analita moguće je uspostaviti različite sisteme merenja kako prisustva polisaharida na mikroorganizmima tako i lektinskih specifičnosti i afiniteta.

## 6. EKSPERIMENTALNI RAD

### 6.1 Određivanje koncentracije proteina

#### 6.1.1 Određivanje koncentracije proteina *Bradford*-ovom metodom

Metoda po *Bradford*-u je verovatno najčešće korišćena metoda za određivanje koncentracije proteina u naučnim laboratorijama. Glavne osobine metode koje je čine toliko široko rasprostranjenom su brzina izvođenja, niska cena, visoka osetljivost i specifično vezivanje proteina (ne vezuje peptidne fragmente i slobodne aminokiseline). U pitanju je kolorimetrijska metoda koja se zasniva na merenju pomeranja maksimuma apsorpcije boje *Comassie Brilliant Blue G-250* sa 470 nm na 595 nm u zavisnosti od toga da li je boja slobodna u rastvoru ili vezana za protein. Mane metode su u tome što standardna prava nije linearna u širem opsegu koncentracija, a odgovor na različite proteine varira<sup>211</sup>.

Rastvori za rad:

1. Koncentrovana boja CBBG-250

CBB G – 250	100 mg
95% etanol	50 mL
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mL
destilovana voda do	200 mL

2. *Bradford*-ov reagens

rastvor 1	100 mL
destilovana voda do	500 mL

Postupak rada:

Test je rađen u mikrotitar pločama sa ravnim dnom (flat bottom well). Kao standard je korišćen goveđi serum albumin (Bovine serum albumin, BSA). BSA je razblažen izotoničnim rasvorom NaCl puferizovanim 10 mM Na fosfatom (phosphate buffered saline; PBS) do finalnih koncentracija 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; 0,75 mg mL<sup>-1</sup>; 0,50 mg mL<sup>-1</sup>; 0,25 mg mL<sup>-1</sup> i 0,10 mg mL<sup>-1</sup> za potrebe konstruisanja kalibracione prave. Kao slepa proba služila je destilovana voda. Uzorci nepoznate koncentracije su nanošeni na mikrotitarsku ploču (5 µL uzorka po bazenu), u triplicatu. Nakon toga u bunare je dodat *Bradford*-ov reagens (200 µL rastvora/bazenu) i

ploče su inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi. Očitavanje vrednosti apsorbance svetlosti na talasnoj dužini od 580 nm, na ELISA čitaču (Labsystems Multiskan Ascent 354 Microplate reader), a vrednosti očitane korišćenjem programa Ascent Software Version 2.4.2.

Vrednosti za koncentracije proteina u uzorcima su preračunate pomoću poznatih koncentracija sa standardne prave dobijene razblaživanjem BSA.

### 6.1.2 Određivanje koncentracije proteina *Lowry*-jevom metodom

*Lowry*-eva metoda je takođe kolorimetrijska metoda se zasniva na reakciji peptidnih veza i bakarnih jona u alkalnoj sredini pri čemu nastaje kompleks koji uz oksido-redukcionu reakciju fosfomolibdensko-fosfovolframovog reagensa sa tirozinom daje postojanu boju, čija se apsorbance meri na 500-600 nm (makrometoda) ili 750 nm (mikrometoda)<sup>212</sup>. *Lowry*-eva metoda je senzitivna za niske koncentracije proteina, od 0.005 – 0.10 mg proteina po mililitru<sup>211</sup>. Međutim, mana metode je izuzetno mali opseg pH, u okviru kog je precizna, zbog čega pH rastvora treba da se održava u opsegu 10-10,5. Na osnovu dobijenih vrednosti apsorbancija za date koncentracije BSA konstruiše se standardna kriva sa koje se određuje koncentracija proteina u rastvorima<sup>213</sup>.

Rastvori za rad<sup>213</sup>:

1. Reagens 1: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1M NaOH

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 g
NaOH	1 g
destilovana voda do	250 mL

2. Reagens 2: 1% rastvor CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O

CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,5 g
destilovana voda do	50 mL

3. Reagens 3: 2% rastvor K-Na-tartarata

K – Na – tartarat	1 g
destilovane vode do	50 L

4. *Folin-Ciocalteu* reagens (*Sigma Aldrich*)

Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	10 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	2,5 g

---

destilovane vode do	70 mL
85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	5 mL
Conc. HCL	10 mL
Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15 g

## 1. Reagens C

Reagens 1	98 mL
Reagens 2	1 mL
Reagens 3	1 mL

2. *Folin-Ciocalteu* reagens, razblažen po uputstvima proizvođača (1+1).

<i>Folin Ciocalteu</i> reagens	1 deo
destilovana voda	1 (2) deo

## Postupak rada:

Test je rađen u mikrotitar pločama sa ravnim dnom. Uzorci biotinih lektina nepoznate koncentracije, u triplikatu, su nanošeni na mikrotitarsku ploču (10  $\mu$ L uzorka/bazenu). Kao standard je sipan BSA različitih koncentracija, za potrebe konstruisanja standardne prave u količini od 10  $\mu$ L. BSA je razblažen destilovanom vodom do finalnih koncentracija 1,0 mg mL<sup>-1</sup>; 0,50 mg mL<sup>-1</sup>; 0,25 mg mL<sup>-1</sup>; 0,125 mg mL<sup>-1</sup>; 0,0625 mg mL<sup>-1</sup>; 0,03125 mg mL<sup>-1</sup>; 0,0 mg mL<sup>-1</sup>; za potrebe konstruisanja kalibracione prave.

Potom je u svaki bunar dodat Reagens C (150  $\mu$ L rastvora po bazenu), ploče su snažno promešane i inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je u svaki bunar dodat *Folin-Ciocalteu* reagens (30  $\mu$ L rastvora po bazenu), ploče su snažno promešane i inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena na 580 nm na ELISA čitaču (Labsystems Multiskan Ascent 354 Microplate reader), a vrednosti očitane korišćenjem programa Ascent Software Version 2.4.2.

Vrednosti za koncentracije proteina u uzorcima su preračunate sa standardne krive BSA/PBS.

## 6.2 Analiza čistoće lektina obeleženih biotinom

### 6.2.1 Natrijum dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je rađena po proceduri Tricinske elektroforeze iz 1987. godine<sup>214</sup>. Elektroforetska razdvajanja proteina su rađena na sistemu za vertikalnu elektroforezu (Mini Protean II System, Bio-Rad, USA) prema instrukcijama proizvođača, u neredukujućim i redukujućim uslovima na 8% poliakrilamidnom gelu za razdvajanje i 5% gelu za koncentrovanje.

Rastvori:

1. Monomerni rastvor akrilamida (AA)

akrilamid	29 g
bis-akrilamid	1 g
destilovana voda do	100 mL

2. Rastvor pufera A (3 M Tris HCl/0,3% SDS, pH 8,45)

Tris	18,15 g
konc. HCl	4 ml (do pH 8,45)
SDS	0,15 g
destilovana voda do	50 mL

3. Inicijator (amonijum persulfat) 10% m/V

APS	0,2 g
destilovana voda do	2 mL

4. Rastvor za nadslojavanje gela pri polimerizaciji (n – butanol zasićen vodom)

n – butanol zasićen vodom

U **Tabeli 6.1** navedeni su rastvori potrebni za pripremu gelova.

**Tabela 6.1. Priprema gradijentnih gelova**

Rastvori	Gel za razdvajanje (8%)	Gel za koncentrovanje (5%)
AA	0,8 mL	0,5 mL
Pufer A	1 mL	0,75 mL
10% APS	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L
TEMED	3 $\mu$ L	3 $\mu$ L
Destilovana H <sub>2</sub> O	1,2 mL	1,75 MI

## 5. 5x koncentrovan Pufer za elektroforezu (donji) (1M Tris HCl, pH 8,9)

Tris	12,1 g
4 M HCl do	pH 8,9
destilovana voda do	100 mL

## 6. Pufer za elektroforezu (gornji) (0,1 M Tris/0,1M Tricin/0,1% SDS, pH 6,8)

0,1 M Tris	2,42 g
0,1 M Tricin	3,6 g
0.1% SDS	0,2 g
destilovana voda do	200 mL

U **Tabeli 6.2** navedena je priprema pufera za pripremu uzoraka (PUZ)

**Tabela 6.2. Priprema neredukujućeg 5x koncentrovanog pufera za pripremu uzoraka**

Rastvori	5X
0,5 M Tris HCl pH 6,8	4,5 mL
99% glicerol	5 mL
SDS	1 g

brom fenol plavo (BFP)	0,5 mg
voda do	10 mL

Napomena: \*Rastvor za pufer za uzorke za redukujuću elektroforezu se pravi tako što se pre dodavanja vode do 10 mL u pufer doda 500  $\mu$ L 2-merkaptetanola.

Postupak rada:

Za proveru integriteta biotinilovanih lektina na osnovu molekulske mase, rađena je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu, sa uzorcima u nativnim i redukujućim uslovima.

Donji gel za razdvajanje (engleski: running) je napravljen prema recepturi datoj u **Tabeli 5.1**, naliven između staklenih ploča i nadslojen rastvorom n-butanola. Nakon polimerizacije, površina gela je isprana destilovanom vodom, nakon čega je osušen i na gel je nanet rastvor gornjeg gela (engleski: stacking) za koncentrovanje proteina napravljen prema recepturi datoj u tabeli **Tabeli 5.1**, i naliven između ploča, iznad gela za razdvajanje. U gel je potom uronjen češalj. Polimerizacija gela za koncentrovanje je trajala 60 minuta nakon čega je uklonjen češalj i držač sa staklenim pločama i gel je uronjen u kadu sa donjim puferom, a između staklenih ploča je naliven gornji pufer.

Rastvori uzoraka lektina i redukujući pufer za pripremu uzoraka u odnosu 4:1 (40  $\mu$ L uzorka i 10  $\mu$ L pufera), korišćeni su za elektroforezu u redukujućim uslovima. Takvi rastvori su inkubirani 2-5 min na 100°C, da bi se proteini kompletno denaturisali. Pri izvođenju neredukujuće elektroforeze korišćen je pufer za uzorke za neredukujuću elektroforezu (bez  $\beta$ -merkaptetanola) i takvi uzorci nisu bili zagrevani.

Na gel je naliveno ~20  $\mu$ L uzorka u odgovarajuće bunare, a potom su dodati proteinski markeri (SDS8B2, Sigma-Aldrich) u zapremini 5  $\mu$ L. Uzorci su koncentrovani tokom prolaska kroz gel za koncentrovanje pri struji od 50 mA, nakon čega su proteini u njima razdvajani na osnovu molekulske mase tokom prolaska kroz gel za razdvajanje pri struji od 100 mA.

Proces elektroforeze je prekinut neposredno pre izlaska BFP iz gela.

### 6.2.2 Bojenje gelova

Rastvori:

1. Rastvor 1  
(Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (20% metanol, 10% glacijalna sirćetna kiselina)

metanol	200 mL
sićetna kiselina	100 mL
destilovana voda do	1000 mL

2. Rastvor boje  
(0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kieselina)

CBB G – 250	0,5 g
Rastvor 1	500 mL

3. Rastvor za obezbojavanje  
(10% sirćetna kieselina)

sićetna kieselina	100 mL
destilovana voda	900 mL

Postupak rada:

Nakon elektroforeze gelovi su prebaćeni u posebne posude i ispirani destilovanom vodom u trajanju od 2 minuta, nakon ćega su na 20 minuta potopljeni u rastvor boje. Nakon odlivanja boje gelovi su potopljeni u rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje na 20 minuta. Gelovi su ćuvani do snimanja u rastvoru za obezbojavanje.

### 6.3 Korićeni sojevi mikroorganizama, kvantifikacija i oblaganje mikrotitarskih ploća

Za ispitivanje afiniteta vezivanja biljnih lektina i profilisanje površinske glikozilacije mikroorganizama korićeno je petnaest Gram pozitivnih bakterija od kojih su neki bili klinićki izolati, obelećeni sa CI: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus rhamnosus* LA68, *Lactobacillus rhamnosus* LB64, *Lactobacillus rhamnosus* LGG, *Lactobacillus helveticus* LAFTI L10, *Lactobacillus acidophilus* ViVag, *Lactobacillus casei* DG, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Streptococcus sp.* CI  $\beta$ -hemolytic group B, *Streptococcus* CI  $\beta$ -hemolytic group A, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* CI, *Staphylococcus aureus* CI, ćetrnaest Gram negativnih bakterija - *Proteus mirabilis* CI, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 2865, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella Typhimurium* CI 2865, *Salmonella Typhimurium* CI 1243, *Salmonella Typhimurium* CI 12, *Salmonella Typhimurium* CI B, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella enteritidis* CI E, pet kvasaca - *Candida albicans* ATCC 10259, *Candida albicans* ATCC 10231, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Cryptococcus neoformans* 79.

Mikroorganizimi korićeni u eksperimentalnom radu, gajeni su u sterilnim polipropilenskim tubama od 50 mL, i njihovi uslovi kultivacije prikazani su u **Tabeli 6.3**.

**Tabela 6.3. Prikaz mikroorganizama, korišćenih u eksperimentalnom radu, njihovog porekla i uslova gajenja**

Red. br.	Vrsta mikroorganizama i soj	Razdeo	Rod	Uslovi kultivacije
1	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	<i>Firmicutes G+</i>	<i>Lactobacillus</i>	MRS 37°C MI
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1			MRS 37°C MI
3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA68			MRS 37°C MI
4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB64			MRS 37°C MI
5	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG			MRS 37°C MI
6	<i>Lactobacillus helveticus</i> LAFTI			MRS 37°C MI
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ViVag			MRS 37°C MI
8	<i>Lactobacillus casei</i> DG			MRS 37°C MI
9	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615			BHI 37°C
10	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813			BHI 37°C
11	<i>Streptococcus sp.</i> CI group B		<i>Streptococcus</i>	BHI 37°C
12	<i>Streptococcus sp.</i> CI group A			BHI 37°C
13	<i>Streptococcus pneumoniae</i>			HEMO-AE 37°C
14	<i>Enterococcus faecalis</i> CI		<i>Enterococcus</i>	BHI 37°C AER
15	<i>Staphylococcus aureus</i> CI		<i>Staphylococcus</i>	NB 37°C AER
16	<i>Proteus mirabilis</i> CI	<i>Proteobacteria G-</i>	<i>Proteus</i>	NB 37°C AER
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883		<i>Klebsiella</i>	NB 37°C AER
18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>Pseudomonas</i>	NB 37°C AER
19	<i>Proteus hauseri</i> ATCC 13315		<i>Proteus</i>	NB 37°C AER
20	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022		<i>Shigella</i>	NB 37°C AER
21	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Escherichia</i>	NB 37°C AER
22	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 2865		<i>Salmonella</i>	NB 37°C AER
23	<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028			NB 37°C AER
24	<i>Salmonella Typhimurium</i> CI 2865			NB 37°C AER
25	<i>Salmonella typhimurium</i> CI 1243			NB 37°C AER
26	<i>Salmonella Typhimurium</i> CI 12			NB 37°C AER
27	<i>Salmonella Typhimurium</i> CI B			NB 37°C AER

**Tabela 6.3. Nastavak**

28	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076			NB 37°C AER
29	<i>Salmonella enteritidis</i> CIE			NB 37°C AER
30	<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	Ascomycota	<i>Candida</i>	SDB 25°C
31	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			SDB 25°C
32	<i>Saccharomyces boulardii</i>		<i>Saccharomyces</i>	SDB 24°C
33	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763			SDB 24°C
34	<i>Cryptococcus neoformans</i> 79	Basidiomycota	<i>Cryptococcus</i>	SDB 24°C

Napomena: MRS – MRS bujon; NB – hranljivi bujon, , SDB – Sabourad dekstrozni bujon, BHI – BHI bujon, MI – mikroaerofilni uslovi, AER – aerobni uslovi.

Odabrani mikroorganizmi zasejavani su u odgovarajuće podloge pri uslovima sterilnog rada u laminarnoj komori (HLB 2448, LaminAir, Heraeus). Najpre je u sterilne tube od 50 mL pipetirano po 40 mL odgovarajućeg medijuma, a potom zasejavano sa 50 µL guste suspenzije mikroorganizama. Nakon toga zasejane bočice su prebačene u inkubator (CO<sub>2</sub>-AUTO-ZERO, Heraeus) tokom 24 sata, kako bi došlo do odgovarajućeg porasta broja mikroorganizama u suspenziji.

Po završetku perioda inkubacije, određivana je količina mikroorganizama u medijumu.

### 6.3.1 Određivanje broja živih mikroorganizama

Određivanje broja colony forming units - CFU po jedinici zapremine, rađeno je prema standardnoj metodologiji, razblaživanjem do željene gustine, te razmazivanjem na čvrstu podlogu i nakon perioda inkubacije, tj. do pojave vidljivog rasta kolonija, brojanjem. Svako merenje rađeno je u triplikatu.

### 6.3.2 Procena odnosa živih prema mrtvim mikroorganizmima pomoću protočne citometrije

Procena odnosa živih mikroorganizama u odnosu na mrtve u prekonočnim kulturama vršena je pomoću protočne citometrije. Prekonočne kulture, isprane u PBS-u su svedene na približno istu optičku gustinu na 620 nm i snimane na FACSVerse protočnom citometru sa i bez dodatka propidijum jodida, prema modifikovanoj metodi Boulosa<sup>215</sup>. Propidijum jodid ulazi u nevijabile ili oštećene bakterije i vezivanjem za DNK dovodi do fluorescence. Propidijum jodid, vezan za DNK se ekscitira se na 488 nm a maksimum emisije mu je na 617 nm. Na 500 µL isprane prekonočne bakterijske kulture razblažene 5-20x u PBS-u dodato je 10 µL propidijum jodida koncentracije 10 µg/mL u PBS-u. Na ovaj način se može odrediti procenat bakterija koje najverovatnije ne predstavljaju jedinicu formiranja kolonije.

### 6.3.3 Određivanje ukupnog broja mikroorganizama brojanjem u hemocitometarskoj komori

Nakon razblaživanja kultura mikroorganizama do finalne optičke gustine 0,1 u 100 µL tečnosti, na talasnoj dužini 620 nm, pristupili smo brojanju ukupnog broja mikroorganizama u

hemocitometarskoj komori (0,100 mm Tiefe Depth, Neubauer Improved, Blaubrand, Germany). Ova hemocitometarska komora sastoji se od 9 velikih kvadrata površine 1 mm<sup>2</sup> svaki. Svaki kvadrat koji se nalazi u uglu je podeljen na 16 kvadratića sa stranicama od 0,25 mm, dok je visina komore kada se prekrije pokrovnim staklom 0,1 mm, tako da se dobije komora dimenzija 1 mm x 1 mm x 0,1 mm, zapremine od 0,1 mm<sup>3</sup> do 10<sup>-4</sup> mL.

Kako bi izbrojali ukupan broj mikroorganizama u hemocitnu komoru sipali smo 10 µL kulture, da bi zatim izbrojali mikroorganizme koji se nalaze u jednom od spoljnih kvadrata. Brojanje mikroorganizama se vrši tako što smo unutar jednog od spoljnih kvadrata odabrali 4 polja (u svakom uglu), u kojima smo izbrojali broj detektovanih mikroorganizama i taj broj podelili sa četiri. Uzorci su potom vizuelizovani pod mikroskopom (Olympus BH-2, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan), uvećanjima 10 x i 40 x u zavisnosti od vrste i veličine mikroorganizama.

### 6.3.4 Određivanje količine mikroorganizama spektrofotometrijski

Nakon inkubacije od 24 sata, tube sa bakterijama su centrifugirane 2000 x g, 20 min, na 4 °C, a sa kvascima 1000 x g, 2 min (3K18, Laboratory Centrifuges, SIGMA). Kulture su isprane, dekantovanjem supernatanta i dodavanjem 50 mL PBS. Zatim su vaje ponovo centrifugirane pri istim uslovima, nakon čega su dekantovane i dodato je 25 mL PBS. Očitavanje vrednosti apsorbance u uzorcima kultura mereno je upotrebom filtera talasne dužine od 620 nm na ELISA čitaču (Labsystems Multiskan Ascent 354 Microplate reader), a vrednosti očitane korišćenjem programa Ascent Software Version 2.4.2.

Na osnovu dobijenih vrednosti i pošto je optička gustina aditivna veličina, kulture mikroorganizama razblažene su u PBS-u do finalne optičke gustine od 0,1 u 100 µL tečnosti u mikrotitarskim pločama sa ravnim dnom, na talasnoj dužini 620 nm.

## 6.4 Oblaganje mikrotitar ploča mikroorganizmima

Nakon prikupljanja rezultata različitih metoda za određivanje broja mikroorganizama izveden je zaključak da je svođenje mikroorganizama na istu optičku gustinu eksperimentalno najjednostavnije i da ujedno da pruža dobru reproducibilnost.

Po razblaživanju mikroorganizama / antigena na željenu optičku gustinu, kulture su nanete u MaxiSorp ELISA mikrotitar ploču sa 96 bunara sa ravnim dnom (Nunc, ThermoFisher Scientific, Denmark), u zapremini od 100 µL po bunaru. Ploče su centrifugirane na 1000 x g, 20 min na 24°C (Megafuge 16R, Heraeus). Po završetku centrifugiranja, supernatant je uklonjen, a zatim ploče postavljene u sušnicu na 50°C, 2 sata (ST-05, Instrumentaria) i skladištene ne duže od 10 dana pre upotrebe.

## 6.5 Korišćeni lektini, obeležavanje lektina biotinom i fluoresceinom

### 6.5.1 Lektini korišćeni u ovoj studiji

Biljni lektini, korišćeni u ovoj studiji, za profilisanje glikana na površini različitih mikroorganizama su: *Maackia amurensis* aglutinin (MAA), Soybean aglutinin (SBA), *Lens culinaris* aglutinin (LCA), Wheat germ aglutinin (WGA), *Ricinus communis* aglutinin

(RCA<sub>120</sub>), *Canavalia ensiformis* lektin (Con A) i *Sambucus nigra* aglutinin (SNA I); nabavljeni od Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Na osnovu procedure definisane od strane Gavrović-Jankulović dobijen je BanLec (*Musa acuminata*) rekombinantni lektin prečišćen iz ćelija *E. Coli*<sup>179</sup>.

U **Tabeli 6.4** navedeni su poreklo i specifičnost vezivanja korišćenih lektina.

**Tabela 6.4. Poreklo i afinitet vezivanja lektina**

Red. br.	Naziv lektina	Poreklo	Afinitet	Ref
1	<i>Maackia amurensis</i> aglutinin -MAA	<i>Maackia amurensis</i>	Neu5Ac $\alpha$ (2,3)Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc/Glc	[12]
2	Soybean aglutinin -SBA	<i>Glycine max</i>	GalNAc $\alpha$ (1,3)Gal>GalNAc, Gal	[8]
3	<i>Lens culinaris</i> aglutinin -LCA	<i>Lens culinaris</i>	methyl- $\alpha$ -Man, Man, Glc	[7]
4	Wheat germ aglutinin -WGA	<i>Triticum vulgare</i>	GlcNAc $\beta$ (1,4)GlcNAc $\beta$ (1,4)GlcNAc> GlcNAc $\beta$ (1,4)GlcNAc>GlcNAc>> Neu5Ac>>GalNAc	[6]
5	<i>Ricinus communis</i> aglutinin – RCA <sub>120</sub>	<i>Ricinus communis</i>	terminalna $\beta$ -D-Gal	[9]
6	Konkanavalin A - Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	3,6-di-O-( $\alpha$ -Man) $\alpha$ Man > Mana (1,3)Man>methyl- $\alpha$ -Man>Man, Glc	[14]
7	<i>Sambucus nigra</i> aglutinin – SNA I	<i>Sambucus nigra</i>	Neu5Ac $\alpha$ (2,6)Gal, Neu5Ac $\alpha$ (2,6)GalNAc	[13]
8	<i>Musa acuminata</i> lektin - BanLec	<i>Musa acuminata</i>	Man, Glc , internal 3-O- $\alpha$ -d-glc, reducing Glc of $\beta$ -1,3-linked glucosyl oligosaccharides	[10],[11]

Napomena: GlcNAc - N-acetil glukozamin, GalNAc - N-acetil galaktozamin, Neu5Ac – sijalinska kiselina, Glc - glukoza, Gal – galaktoza, Man – manozna

### 6.5.2 Obeležavanje lektina biotinom

Nakon rastvaranja komercijalnih lektina u PBS izmena pufera rađena je dijalizom. Membrana za mikrodijalizu čuvana je u frižideru na temperaturi od 2-8 °C u 20% etanolu sa 0,1% NaN<sub>3</sub>. Neposredno pre korišćenja izvađena je iz frižidera i nekoliko puta isprana vrućom destilovanom vodom. Rastvoreni lektini su preko noći dijalizovani, u aparatu za kontinuiranu dijalizu, naspram 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9,5.

Za biotiničenje lektina upotrebljen je (+)-Biotin N-sukcinimidil estar (SigmaAldrich, Steinheim, Nemačka) prethodno rastvoren u anhidrovanom dimetil-sulfoksidu (DMSO), do koncentracije 22 mg mL<sup>-1</sup> i dodat u rastvor lektina u odnosu 10% V/V. Rastvor je zaštićen od

svetlosti i inkubiran na 37 °C uz konstantno mešanje u trajanju od 3 h. Nakon konjugovanja sa biotinom lektini su dijalizovani preko noći naspram rastvora PBS.

Biotinilovani lektini su analizirani elektroforezom (8% gel za razdvajanje, 5% gel za koncentrovanje). U rastvore lektin-B / PBS dodato je 50% glicerola, sa 0.2% NaN<sub>3</sub> i skladišteni su na -20 °C do upotrebe. Koncentracija lektina nakon biotinilovanja određivana je Lowrijevom metodom<sup>212, 213</sup>.

### 6.5.3 Dot blot

Kako bi procenili efikasnost biotinilovanja i odabrali adekvatna radna razblaženja lektina korišćen je dot blot. Nakon pravljenja odgovarajućih razblaženja, 2 µL rastvora svakog lektina naneto je na nitroceluloznu membranu (NC2, SERVA Electrophoresis GmbH Heidelberg, Nemačka). Nakon sušenja, membrana je hidratizirana potapanjem u PBS, a zatim je blokirana sa 2% BSA u PBS (2% BSA/PBS) i tako inkubirana 30 minuta. Membrana je isprana 3 puta u 0,05 % Tween 20 (SigmaAldrich, Steinhaim, Germany) rastvorenom u PBS (PBS/Tween) i jednom u PBS. Nakon inkubacije, membrana je inkubirana sa ExtrAvidin-alkalnom fosfatazom (087K4761, Sigma-Aldrich, Steinhaim, Germany) razblaženom 1:70000 i tako inkubirana još 30 min. Membrana je isprana 3 puta u PBS/Tween i jednom u PBS. Vizuelizacija je izvršena supstratom, 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat/nitro blue tetrazolim (BCIP/NBT; SigmaAldrich, Steinhaim, Germany) rastvorenom u puferu za alkalnu fosfatazu.

## 6.6 *In vitro* ispitivanje vezivnih karakteristika lektina primenom ELISA i ELLSA

ELLSA predstavlja enzimski lektin test, koji se može koristiti za detekciju interakcija koje se ostvaruju između lektina i glikana koji se nalaze na površini mikroorganizama. Ispitivanje vezivnih karakteristika lektina obuhvatalo je:

- detekciju vezivanja biotinisanih biljnih lektina za mikroorganizme pomoću extrAvid-Alkalne fosfataze i 4-nitrofenil fosfata
- serijsku titraciju biotinilovanih lektina i njihovo vezivanje za mikroorganizme
- inhibiciju vezivanja lektina različitim monosaharidima
- *β*-glukan ELLSA
- određivanje nivoa serumskog IgG i IgG potklasa specifičnih prema odabranim mikroorganizmima
- određivanje nivoa serumskog IgA i IgA potklasa specifičnih prema odabranim mikroorganizmima
- određivanje afiniteta vezivanja biljnih lektina za antigenske determinante u virusnim vakcinama

## Rastvori:

## 1. 10 x PBS

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
destilovana voda	do 1 L

## 2. 1 x PBS

10 x PBS	50 mL
destilovana voda do	500 mL

## 3. 0.05% tPBS

1xPBS	300 mL
Tween 20	150 µL

## 4. 1% Rastvor BSA

BSA	0,4 g
PBS do	40 mL

## 5. Pufer za alkalnu fosfatazu

Tris	3,152 g
NaCl	1,168 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,2 g
destilovana voda do	100 mL
4M HCl	do pH 9,5

destilovana voda do 200 mL

6. Rastvor ExtrAvidin – Alkalne Fosfataze (087K4761, Sigma-Aldrich) 1:30000

ExtrAvidin Alkalna Fosfataza 0,4  $\mu$ L

1xPBS 12 mL

7. Rastvor supstrata (pNPP) (71768, Sigma-Aldrich)

p-Nitrofenil Fosfat 20,4 mg

Pufer za alkalnu fosfatazu 12 mL

Postupak rada:

Zajednički koraci za sve ELLSA testove najpre podrazumevaju da su mikroorganizami / antigeni određene koncentracije u zavisnosti od tipa ELLSA testa adsorbovani na mikrotitar ploču, sa 96 bunara sa ravnim dnom (MaxiSorp, Nunc, ThermoFisher Scientific, Denmark).

Suve mikrotitar ploče sa adsorbovanim različitim mikroorganizmima, odgovarajuće optičke gustine su saturisane rastvorom 1% BSA/PBS (w/v) (200  $\mu$ L po bunaru, 1 h na sobnoj temperaturi) kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje. Razblaženja lektina su pravljena u PBS-u ili u rastvoru 1% BSA/PBS, kao i komercijalno dostupna antitela i enzimi korišćeni u detekciji. Komercijalna antitela, kao i enzimi razblaživani su prema uputstvu proizvođača u PBS i u rastvoru 1% BSA/PBS. Rastvor enzima extrAvidin-Alkane Fosfataze (087K4761, Sigma-Aldrich, Steinhaim, Germany) razblažen je u PBS u razblaženju 1:30,000 i naliven u ploču (50  $\mu$ L po bunaru, 30 min na sobnoj temperaturi). Vizuelizacija je vršena dodavanjem rastvora supstrata pNPP (50  $\mu$ L/bunaru).

Svakom od ovih inkubacionih koraka (zapremina reagensa 50  $\mu$ L po bunaru,, inkubacija 1 h ili 30 min na sobnoj temperaturi) prethodi trostruko ispiranje rastvorom 0,05 % Tween 20/PBS (200  $\mu$ L/bunaru) i jedno ispiranje PBS-om (200  $\mu$ L/bunaru). Ploče su sa supstratom alkalne fosfataze inkubirane sve do pojave intenzivno žutog bojenja, nakon čega su očitavane vrednosti apsorbance uzoraka na talasnim dužinama od 405 nm i 620 nm na ELISA čitaču (Labsystems Multiskan Ascent 354 Microplate reader), a vrednosti očitane korišćenjem programa Ascent Software Version 2.4.2.

Specifičnosti pojedinačnih ELISA su navedene u daljem tekstu.

### 6.6.1 Detekcija vezivanja biotinilovanih biljnih lektina za mikroorganizme

Na mikrotitar ploče (MaxiSorp) sa adsorbovanim mikroorganizmima u određenoj koncentraciji ( $0,5-1,0 \times 10^8$  mL<sup>-1</sup> bakterija i  $0,5-1,0 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup> gljiva), dodati su u multilikatu, biotinilovani lektini razblaženi u PBS-u, sledećih razblaženja: MAA 1:100, SBA 1:2000, LCA

1:2000, WGA 1:2000, RCA<sub>120</sub> 1:1000, ConA 1:2000, SNA I 1:1000 i BanLec 1:1000 (50  $\mu$ L po bunariću, 1 h na sobnoj temperaturi) kako bi se registrovalo prisustvo ili odsustvo vezivanja.

Svi naredni koraci su identični prethodno opisanim: dodavanje rastvora extrAvidina; detektovanje vezanih lektina pomoću supstrata; vizuelizacija i dobijanje A<sub>405/620</sub>.

### 6.6.2 Serijska titracija biotinilovanih lektina

Mikrotitar ploče (MaxiSorp) sa adsorbovanim mikroorganizmima u određenoj koncentraciji (0.5-1,0x10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup> bakterija i 0.5-1,0x10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup> gljiva), blokirane su sa 1% BSA/PBS (w/v) (200  $\mu$ L po bunaru, 1 h na sobnoj temperaturi) kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje. Ispiranje je vršeno kao u opštoj proceduri. Napravljena su serijska razblaženja biotinilovanih lektina razblaženih u PBS-u, koja su u mutiplikatu nalivena u bunare sa odgovarajućim mikroorganizmima (50  $\mu$ L/bunaru, 1 h na sobnoj temperaturi) kako bi se odredila minimalna količina lektina koja je neophodna za detekciju interakcija između lektina i mikroorganizama.

Svi naredni koraci su identični prethodno opisanim: dodavanje rastvora extrAvidina u PBSu; detektovanje vezanih lektina pomoću supstrata; vizuelizacija i dobijanje A<sub>405/620</sub>.

### 6.6.3 Inhibicija vezivanja lektina različitim monosaharidima

Na mikrotitar ploče (MaxiSorp) sa adsorbovanim mikroorganizmima u određenoj koncentraciji (0.5-1,0x10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup> bakterija i 0.5-1,0x10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup> gljiva), nakon blokiranja dodati su lektini preinkubirani sa 0,5 M rastvorom jednake količine glukoze, manoze i galaktoze, ili 0,5 M rastvorom pojedinačnih monosaharida (50  $\mu$ L po bunaru, 1 h na sobnoj temperaturi) kako bi se registrovala inhibicija vezivanja, nakon čega je izvršeno trostruko ispiranje rastvorom 0,05% Tween 20 / PBS (200  $\mu$ L po bunaru, pa odlivanje supernatanta) i jedno ispiranje PBS-om (200 $\mu$ L po bunaru, pa odlivanje supernatanta).

Svi naredni koraci su identični prethodno opisanim: dodavanje rastvora extrAvidina; detektovanje vezanih lektina pomoću supstrata; vizuelizacija i dobijanje A<sub>405/620</sub>.

### 6.6.4 $\beta$ -glukan ELLSA

Nakon rastvaranja  $\beta$ -glukan-a iz ječma (08168, Sigma-Aldrich) / PBS u koncentraciji od 2,5 mg mL<sup>-1</sup>, rastvor je naliven u MaxiSorp ELISA mikrotitar ploču sa 96 bunara i F dnom (50  $\mu$ L po bunaru), a zatim su ploče inkubirane preko noći na 4 °C. Blokiranje je izvršeno 1% BSA/PBS, praćeno ispiranjem kao u opštoj proceduri. Dodata su serijska razblaženja BanLec, u duplikatu (50  $\mu$ L po bunaru, 1 h na sobnoj temperaturi).

Svi naredni koraci su identični prethodno opisanim: dodavanje rastvora extrAvidina; detektovanje vezanih lektina pomoću supstrata; vizuelizacija i dobijanje A<sub>405/620</sub>.

### 6.6.5. Određivanje nivoa serumskog IgG i IgG potklasa specifičnih prema odabranim mikroorganizmima

Mikrotitar ploče (MaxiSorp) sa adsorbovanim mikroorganizmima u određenoj koncentraciji (0,5-1,0 x10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup> bakterija i 0,5-1,0 x10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup> gljiva), saturisane su rastvorom 1% BSA/PBS (200  $\mu$ L po bunaru, 1 h, sobna temperatura) kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje. Potom je usledilo trostruko ispiranjem rastvorom 0,05% Tween 20/PBS (200  $\mu$ L/bunaru) i jedno ispiranje PBS-om (200  $\mu$ L/bunaru, pa odlivanje supernatanta). Zatim je

naliven pul humanih seruma u razblaženju 1:500 u 1% BSA/PBS za ukupni IgG, IgG1 i IgG2, dok su IgG3 i IgG4 određivani u razblaženju 1:250.

Inhibicija mešavinom monosaharida rađena je tako što je u duplikate bunara sa istim mikroorganizmima naliven pul humanih seruma u istom razblaženju u koje su dodati monosaharidi u koncentraciji 0,5 M (jednake količine glukoze, manoze i galaktoze).

Pul seruma je dodat u količini od 50  $\mu\text{L}$  po bunaru, inkubirano je 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, izvršeno trostruko ispiranje rastvorom 0,05 % Tween 20/PBS (200  $\mu\text{L}$ /bunaru, pa izbacivanje supernatanta) i jedno ispiranje PBS-om (200  $\mu\text{L}$ /bunaru, pa odlivanje supernatanta). Po završetku ispiranja, u duplikatu su nalivena antitela specifična za humani IgG, i potklase IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4 u razblaženjima: 5000x, 1000x, 1000x, 3000x i 1000x, redom.

Svi naredni koraci su identični prethodno opisanim: dodavanje rastvora extrAvidina; detektovanje vezanih antitela pomoću supstrata merenjem  $A_{405/620}$ .

#### **6.6.6 Određivanje nivoa serumskog IgA i IgA potklasa specifičnih prema odabranim mikroorganizmima**

Mikrotitar ploče (MaxiSorp) sa adsorbovanim mikroorganizmima u određenoj koncentraciji ( $0,5-1,0 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$  bakterija i  $0,5-1,0 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$  gljiva), saturisane su rastvorom 1% BSA/PBS (200  $\mu\text{L}$  po bunaru, 1 h, sobna temperatura, a po isteku inkubacije odlivanje supernatanta) kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje. Potom je usledilo trostruko ispiranjem rastvorom 0,05 % Tween 20/PBS (200  $\mu\text{L}$ /bunaru, pa izbacivanje supernatanta) i jedno ispiranje PBS-om (200  $\mu\text{L}$ /bunaru, pa odlivanje supernatanta).

Zatim je naliven pul humanih seruma u razblaženju 1:100 u 1% BSA/PBS za ukupni IgA, dok su IgA1 i IgA2 određivani u razblaženju 1:50.

Inhibicija mešavinom monosaharida rađena je tako što je u duplikate bunara sa istim mikroorganizmima naliven pul humanih seruma u istom razblaženju u koje su dodati monosaharidi u koncentraciji 0.5 M (jednake količine glukoze, manoze i galaktoze).

Serumi su dodvani u količini od 50  $\mu\text{L}$  po bunaru, inkubirano je 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, izvršeno trostruko ispiranje rastvorom 0,05 % Tween 20 / PBS (200  $\mu\text{L}$ /bunaru, pa izbacivanje supernatanta) i jedno ispiranje PBS-om (200  $\mu\text{L}$ /bunaru, pa odlivanje supernatanta). Po završetku ispiranja, u duplikatu su nalivena antitela specifična za humani IgA, IgA1 i IgA2 u razblaženju 1000x.

Svi naredni koraci su identični prethodno opisanim: dodavanje rastvora extrAvidina; detektovanje vezanih antitela pomoću supstrata merenjem  $A_{405/620}$ . Osim što za anti-humani IgA1 direktno obeležen alkalnom fosfatom nije bilo potrebno dodavati ExtrAvidin-AP.

#### **6.6.7 Određivanje afiniteta vezivanja biljnih lektina za različite tipove virusnih vakcina**

Kao doza vakcine neophodna za procenu virusne glikozilacije, korišćena je jedna humana doza u svakoj ELLSA, drugim rečima zapremine bočice sa vakcinom je razblažena sa 6 mL rastvora PBS. Nakon nanošenja na MaxiSorp ploču inkubirano je preko noći na 4°C.

Blokiranje je izvršeno 1% BSA/PBS, praćeno ispiranjem kao u opštoj proceduri. Dodata su serijska razblaženja lektina, u duplikatu (50  $\mu$ L po bunaru, 1 h na sobnoj temperaturi).

Svi naredni koraci su identični prethodno opisanim: dodavanje rastvora extrAvidina; detektovanje vezanih lektina pomoću supstrata; vizuelizacija i dobijanje A<sub>405/620</sub>.

U ovim eksperimentima korišćeni su sledeće vakcine:

**Varilix** je vakcina od živog atenuiranog varićela-zoster (soj *Oka*) virusa sa 10<sup>3,3</sup> jedinice koje formiraju plak (PFU); za intramuskularnu primenu. Virus je razmnožen u MRC5 ljudskim diploidnim ćelijama. Vakcina sadrži 6 mg sorbitola po dozi. Proizveo GlaxoSmithKline (GSK). Uključena lista pomoćnih supstanci su: aminokiseline, laktoza, manitol, sorbitol.

**Twinrix Adult** je dvovalentna vakcina, koja sadrži dve antigene komponente: inaktivirani virus hepatitisa A (soj *HMI75*) i površinski antigen virusa neinfektivnog hepatitisa B (HBsAg). Virus hepatitisa A umnožava u MRC-5 ljudskim diploidnim ćelijama i inaktivira se formalinom, dok se prečišćeni HBsAg dobija kultivisanjem genetski modifikovanih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, koje u sebi nose gen površinskog antigena virusa hepatitisa B. Preparati svakog antigena se adsorbuju odvojeno na soli aluminijuma i zatim spajaju tokom formulacije vakcine. Proizveo GlaxoSmithKline (GSK).

**BBIBP-CorV** je inaktivisana vakcina, protiv SARS-Cov-2 virusa. Virus je umnožen u VERO ćelijama i inaktiviran  $\beta$ -propiolaktonom. Virusni preparati adsorbovan je na soli aluminijuma. Proizveo Sinopharm, Pekinški institute za biološke proizvode.

**TorVaxFlu** je trovalentna, sezonska, splitovana, inaktivisana vakcina protiv gripa. Virusi je umnožen u embrionisanim kokošnjim jajima, splitovan Tritonom X-100 i inaktivisan  $\beta$ -propiolaktonom. Sastav vakcine određen je prema preporukama SZO, za severnu hemisferu i Evropsku uniju, za sezonu 2020/ 2021: *A/Guangdong-Maonan/SVL1536/2019* (H1N1) pdm09 – sličan soj (*A/Guangdong-Maonan/SVL1536/2019*, CNIC-1909), 15  $\mu$ g HA; *A/Hong Kong/2671/2019* (H3N2) – sličan soj (*A/Hong Kong/2671/2019*, NIB-121) 15  $\mu$ g HA; *B/Washington /02/2019* – sličan soj (*B/Victoria lineage*) 15  $\mu$ g HA po dozi od 0,5 mL. Proizveo Institut za virusologiju, vakcine i serume, Torlak, Srbija. Može da sadrži tragove pilećeg ovalbumina, neomicina, Triton X-100 i b-propiolaktona.

**Influvac Tetra** je četvorovalentna, sezonska, splitovana, inaktivisana vakcina protiv gripa. Virusi je umnožen u embrionisanim kokošnjim jajima, splitovan Tritonom X-100 i inaktivisan formaldehidom. Sastav vakcine određen je prema preporukama SZO, za severnu hemisferu i Evropsku uniju, za sezonu 2020/ 2021: *A/Guangdong-Maonan/SVL1536/2019* (H1N1) pdm09 – sličan soj (*A/Guangdong-Maonan/SVL1536/2019*, CNIC-1909), 15  $\mu$ g HA; *A/Hong Kong/2671/2019* (H3N2) – sličan soj (*A/Hong Kong/2671/2019*, NIB-121) 15  $\mu$ g HA; *B/Washington/02/2019* – sličan soj (*B/Victoria lineage*) 15  $\mu$ g HA po dozi od 0,5 mL; *B/Phuket/3073/2013* – sličan soj (*B/Yamagata lineage*) 15  $\mu$ g HA po dozi od 0,5 mL. Proizveo Abbott Biologicals, Holandija. Može da sadrži tragove pilećeg ovalbumina, gentamicin, polisorbitat 80 i formaldehid.

Uticaj aluminijumskih adjuvanasa na ovaj test ispitan je tako što je Varilixu dodat aluminijum fosfatni gel u odgovarajućoj koncentraciji i paralelno je postavljen test na Varilix sa i bez aluminijuma sa dva različita lektina, ConA i PHA, uz variranje koncentracije biotinirovanih lektina.

Paralelno je testirano i vezivanje lektina za VERO ćelije. VERO ćelije su gajane u flaskovima za kultivaciju ćelija zapremine 50 mL, u kompletnom RPMI-1640 medijumu sa dodatkom 10% seruma telećeg fetusa (engleksi: fetal calf serum; FCS) i 50  $\mu\text{m}$   $\beta$ -merkaptopetanolu. S obzirom na to da su VERO adherentne ćelije, da bi se dobile ćelije u suspenziji, nakon formiranja monosloja uklonjen je supernatant, a monolejer je ispran svežim RPMI-1640 medijumom bez FCS. Zatim je na ćelije sipan rastvor tripsin/EDTA (Sigma T4299) zagrejan na 37°C do pokrivanja površine flaska, inkubirano je 2 min, a zatim „odlepljivanje“ praćeno pod mikroskopom, i potpomognuto blagim lupkanjem dna flaska. Ćelijska suspenzija je zatim nekoliko puta propuštena kroz pipetu, prebaćena u flask od 50 mL i na nju je dodata jednaka zapremina kompletnog RPMI-1640 medijuma sa dodatkom 10% FCS. Nakon taloženja, centrifugiranja na 400 x g u trajanju od 10 min, ćelije isprane centrifugiranjem, jednom u istom medijumu, a zatim dva puta PBS.

Ćelije su prebrojane u hemocitometarskoj komori, uz dodatak Turk-ovog rastvora pod svetlosnim mikroskopom. Ćelijska suspenzija od  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  u PBS je nanešena u kolićini od 100  $\mu\text{L}$  po bunaru. Nakon centrifugiranja na 400xg u trajanju od 10 min supernatant je uklonjen izvrtanjem na papirnu vatu i ćelije su ostavljene na sobnoj temperaturi do potpunog sušenja.

Blokiranje je izvršeno 1% BSA/PBS, praćeno ispiranjem kao u opštoj proceduri. Dodata su serijska razblaženja lektina, u duplikatu (50  $\mu\text{L}$  po bunaru, 1 h na sobnoj temperaturi).

Svi naredni koraci su identični prethodno opisanim: dodavanje rastvora extrAvidina; detektovanje vezanih lektina pomoću supstrata; vizuelizacija i dobijanje A405/620.

## 6.7 Protoćna citometrija

### 6.7.1 Obeležavanje lektina fluorescein-om

Fluorescein 5(6)-izotiocijanat (FITC, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), rastvoren je u di-metil sulfooksidu (DMSO) do koncentracije 1 mg  $\text{mL}^{-1}$ , a zatim je dodat u zapremini od 50  $\mu\text{L}$  u rastvor lektina. Rastvor je inkubiran na 25 °C, u mraku, uz konstantno mešanje u trajanju od 2 h. Potom je dodat  $\text{NH}_4\text{Cl}$  do finalne koncentracije 50 mM, a rastvor je inkubiran na 4 °C u trajanju od 2 h. Nakon konjugovanja lektina FITC-om, konjugat je dijalizom preveden/rastvoren u PBS. Membrana za mikrodijalizu ćuvana je u frižideru na temperaturi od 2-8 °C u 0,05%-om  $\text{NaN}_3$ . Neposredno pre korišćenja je izvaćena iz frižidera i nekoliko puta isprana sa destilovanom vodom. FITC-ovani lektini su preko noći dijalizovani, aparatom za kontinuiranu dijalizu, naspram rastvora PBS-a.

### 6.7.2 Analiza vezivanja lektina za mikroorganizme protoćnom citometrijom

Nakon prećišćavanja kultura mikroorganizama kultivisanih preko noći, odrećena je koncentracija mikroorganizama i kulture su razblažene u PBS-u do finalne optićeke gustine od 0,5 na talasnoj dućini 620 nm.

U sterilne, nepirogene, polistirenske tube od 5 mL sa zakrivljenim dnom (352052, Falcon, Mexico) naliveni su uzorci/mikroorganizmi (100  $\mu\text{L}$  po tubi), zatim je dodata različita kolićina FITC-om obeleženih lektina, uzorci su promešani i inkubirani 15 min na 4 °C. Uzorci su isprani PBS-om (400  $\mu\text{L}$  po tubi), centrifugirani na 2000 x g, 15 min na 24 °C (3K18, Laboratory Centrifuges, SIGMA), a zatim je odliven supernatant. Nakon još jednog ispiranje

PBS-om (600  $\mu$ L/tubi) i centrifugiranja na 2000 x g, 15 min na 24 °C (3K18, Laboratory Centrifuges, SIGMA), odliven je supernatant a zatim je dodat fiksativ, 1% paraformaldehid u PBS (200  $\mu$ L po tubi).

Signali iz uzoraka su analizirani na BD FACSVerse (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

## 6.8 Fluorescentna mikroskopija

Nakon prečišćavanja gljiva kultivisanih preko noći, određena je koncentracija i kulture su razblažene u 0,01% NaN<sub>3</sub>/PBS, do finalne optičke gustine od 0,5 na talasnoj dužini 620 nm. U uzorke od 100  $\mu$ L dodato je 2  $\mu$ g biotinom obeleženog BanLec, uz mešanje i inkubaciju 15 min na 4 °C. U kontrolne uzorke nije dodavan biotinilovan BanLec. Uzorci su zatim u 3 mL PBS, i centrifugirani na 1000 x g, 2 min na 24 °C (3K18, Laboratory Centrifuges, SIGMA), nakon čega je odliven supernatant. Nakon još jednog ispiranja i centrifugiranja pod istim uslovima, dodat je 1  $\mu$ g Streptavidin-FITC-a (Biolegend, San Diego, CA), za kojim je sledila inkubacija od 15 min na 4 °C. Nakon ponovnog ispiranja i centrifugiranja pod navedenim uslovima, nakon čega su uzorci analizirani pod fluorescentnim mikroskopom (Olympus BH-2, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan), korišćenjem filtera BG 12, barijer filtera Y495 i digitalne kamere (Color View III digital camera, Olympust Soft Imaging Solutions GmbH, Munster, Germany). Slike su analizirane u programu AnalySIS FIVE.

## 6.9 Analiza kinetike vezivanja lektina za mikroorganizme

Kinetika vezivanja lektina za mikroorganizme je ispitivana QCM tehnologijom, korišćenjem uređaja Attana 200 System i LNB (engleski: low nonspecific binding)-karboksilnih čipova. S obzirom da smo želeli da imamo dostupnu kompletnu površinu bakterija kako bi ispitili kinetiku vezivanja lektina, primenili smo pristup koji su razvili Kalograiaki et al. 2018<sup>156</sup>. Ovaj metod podrazumeva *ex situ* nanošenje bakterija na čip prekriven lektinom i njihovu fiksaciju. Nakon vezivanja i fiksiranja bakterija injektuju se neobeleženi lektini i prati se interakcija lektina i mikroorganizama u realnom vremenu.

### 6.9.1 Aktivacija LNB-karboksilnog čipa

QCM senzor čip korišćen u ispitivanju, bio je LNB-karboksil koji predstavlja matriks za kuplovanje proteina na površini, preko slobodnih amino grupa proteina, u ovom slučaju lektina. Prvi korak u aktivaciji čipa bio je hidratacija kvarca na čipu sa 10  $\mu$ L destilovane vode, inkubacija 30 min. Potom je ConA imobilisan na površinu LNB čipova A i B upotrebom kita za kuplovanje amina.

Priprema rastvora za kuplovanje:

- 1) EDC(1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodimid hidrohlorid) i Sulfo-NHS (N-hidroksisulfosukcinimid) rastvoreni su u 3,3 mL destilovane vode. Zatim je epruveta sa EDC centrifugirana.
- 2) EDC (0,4 M) i Sulfo-NHS (0,1 M) su pomešani u odnosu 1:1

Rastvori za rad:

1. 0,005% tPBS (radni pufer)
 

1xPBS	300 mL
Tween 20	15 $\mu$ L
2. 10 mM sirćetna kiselina pH4 (imobilizacioni pufer)
 

Natrijum acetat	6,8 g
destilovana voda do	500 mL

\*podešavanje do pH4 glacijalnom sirćetnom kiselinom

Postupak rada:

LNB-karboksilni senzor čipovi su ubačeni i fiksirani u aparat Attana 200 QCM biosenzor, a zatim je pokrenut program Attester Software. Temperatura je podešena na 22° C, protok tPBS preko površine čipova podešen je na 100  $\mu$ L/min sve dok se nije stabilizovala bazna linija (promena frekvence  $\leq$  0,2 Hz, preko 10 min). Potom je protok smanjen na 10  $\mu$ L/min i svež aktivacioni miks EDC-a i Sulfo-NHS-a je injektovan u trajanju od 300 s. Po isteku ovog vremena, injektovano je 50  $\mu$ g/mL rastvora ConA u 10 mM sirćetnoj kiselini, pH 4, čiji je protok trajao 300 s. Nakon isteka vremena, injektovanje rastvora ConA je ponovljeno pri istim uslovima. Na kraju je injektovan rastvor za deaktivaciju, 1 M etanolamin, pH 8,5, uz protok od 20  $\mu$ L/min koji je injektovan 300 s, do formiranja bazne linije.

### 6.9.2 Fiksiranje bakterija na LNB-karboksilni čip

Nakon aktivacije čipa i fiksiranja lektina ConA, čipovi su izvađeni iz aparata, i kvarcna pločica čipa A je izvađena iz plastičnog držača. Kvarcna pločica čipa A inkubirana je sa 50  $\mu$ L bakterijske suspenzije *L. helveticus* LAFTI, optičke gustine 1, tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije kvarcna površina je isprana tri puta sa tPBS, i zatim inkubirana sa 50  $\mu$ L 4% formaldehida, 10 min na 4° C. Po završetku fiksacije bakterija formaldehidom kvarcna pločica je dobro isprana tPBS-om i čipovi su pažljivo sastavljeni, ubačeni u aparat i ostavljeni preko noći uz konstantan protok tPBS-a od 20  $\mu$ L/min, kako bi se površina čipa dobro isprala i bazna linija stabilizovala.

### 6.9.3 Analiza kinetike vezivanja QCM metodom

Nakon formiranja bazne linije injektovano je 180  $\mu$ L tPBS-a, tokom 84 s, koji je služio kao blank merenju, nakon čega je još 600 s išao tPBS kroz sistem do ponovne stabilizacije bazne linije. Nakon toga injektovani su u duplikatu rastvori lektina: ConA, LCA, MAA i SBA. Svi lektini su rastvoreni iz suve supstance u količini 1 mg/mL, međutim nakon određivanja koncentracije proteina *Bredford*-ovom metodom koncentracije su iznosile: ConA 0,4 mg/mL, LCA 0,84 mg/mL, MAA 0,05 mg/mL, SBA 0,38 mg/mL. Svi lektini su injektovani pojedinačno 84 s, nakon čega je još 600 s išao radni pufer, po isteku tih 600 s površine su regenerisane injektovanjem 10 mM glicina pH 1,2, 0,5 M NaCl pulsom od 30 s, nakon čega su re-ekvilibrisane radnim puferom. Dobijeni podaci su sakupljeni korišćenjem Attester software-a, a analiza je urađena korišćenjem Evaluation software-a.

## 7.0 Statistička analiza

Korelacija između promenljivih je određena *Pearson*-ovom bivarijantnom korelacionom analizom, u *OriginLab-u 8.0*, gde je određivan *Pearson*-ov koeficijent korelacije (*Pcc*).

Za kalkulacije IC50 vrednosti korišćen je *GraphPad Prism 5* program.

Grafičke prezentacije su urađene u *GraphPad Prism 5.*, *OriginLab 8.0* i *BD FACSuite software*.

## 7. LITERATURA

1. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. **Antibiotics: past, present and future.** *Curr Opin Microbiol.* 2019;51:72-80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008
2. Walsh TR, Howe RA. **The Prevalence and Mechanisms of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus Aureus*.** *Annu Rev Microbiol.* 2002;56(1):657-675. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160806
3. Blaser M. **Stop the killing of beneficial bacteria.** *Nature.* 2011;476(7361):393-394. doi:10.1038/476393a
4. Avison MB. **Preliminary analysis of the genetic basis for vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strain Mu50.** *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(2):255-260. doi:10.1093/jac/49.2.255
5. Clardy J, Fischbach MA, Walsh CT. **New antibiotics from bacterial natural products.** *Nat Biotechnol.* 2006;24(12):1541-1550. doi:10.1038/nbt1266
6. Brogden RN, Carmine A, Heel RC, Morley PA, Speight TM, Avery GS. **Amoxicillin/Clavulanic Acid.** *Drugs.* 1981;22(5):337-362. doi:10.2165/00003495-198122050-00001
7. Tra VN, Dube DH. **Glycans in pathogenic bacteria – potential for targeted covalent therapeutics and imaging agents.** *Chem Commun.* 2014;50(36):4659-4673. doi:10.1039/C4CC00660G
8. Dube DH, Champasa K, Wang B. **Chemical tools to discover and target bacterial glycoproteins.** *Chem Commun.* 2011;47(1):87-101. doi:10.1039/C0CC01557A
9. Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, et al. **Bacterial Meningitis in the United States in 1995.** *N Engl J Med.* 1997;337(14):970-976. doi:10.1056/NEJM199710023371404
10. Reid CW, Fulton KM, Twine SM. **Never take candy from a stranger: the role of the bacterial glycome in host–pathogen interactions.** *Future Microbiol.* 2010;5(2):267-288. doi:10.2217/fmb.09.103
11. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. **The Bacterial Cell Envelope.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(5):a000414-a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414

12. Brown S, Santa Maria JP, Walker S. **Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria.** *Annu Rev Microbiol.* 2013;67(1):313-336. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155620
13. Schmidt MA, Riley LW, Benz I. **Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens.** *Trends Microbiol.* 2003;11(12):554-561. doi:10.1016/j.tim.2003.10.004
14. Lowry R, Balboa S, Parker JL, Shaw JG. **Aeromonas Flagekka and Colonisation Mechanisms.** *Adv Microb Physiol.* 2014;65:203-256. doi: 10.1016/bs.ampbs.2014.08.007
15. Gao S, Lewis GD, Ashokkumar M, Hemar Y. **Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria.** *Ultrasonics Sonochemistry.* 2014;21(1): 446–53. doi:10.1016/j.ultsonch.2013.06.006
16. Hathaway LJ, Grandgirard D, Valente LG, Täuber MG, Leib SL. **Streptococcus pneumoniae capsule determines disease severity in experimental pneumococcal meningitis.** *Open Biology.* 2016;6(3): 150269. doi:10.1098/rsob.150269
17. Ponton J. **The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin.** *Rev Iberoam Micol.* 2008;25(2) 78-82. doi:10.1016/s1130-1406(08)70024-x
18. Agostinho DP, Miller LC, Li LX, Doering TL. (2018). **Peeling the onion: the outer layers of *Cryptococcus neoformans*.** *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2018;113(7). doi: 10.1590/0074-02760180040
19. Gow NAR, Latge JP, Munro CA. **The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function.** *Microbiol. Spectr.* 2017;5(3) doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
20. Douglas CM, Foor F, Marrinan JA, Morin N, Nielsen JB, Dahl AM, Mazur P, Baginsky W, Li W, el-Sherbeini M. **The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(26):12907-12911. doi: 10.1073/pnas.91.26.12907
21. Qadota H, Python CP, Inoue SB, Arisawa M, Anraku Y, Zheng Y, Watanabe T, Levin DE, Ohya Y. **Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase.** *Science.* 1996;272(5259):279-281. doi: 10.1126/science.272.5259.279
22. Chattaway FW, Holmes MR, Barlow AJ. **Cell wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*.** *J Gen Microbiol.* 1968;51(3):367-76. doi: 10.1099/00221287-51-3-367
23. Bowman SM, Free SJ. **The structure and synthesis of the fungal cell wall.** *Bioessays.* 2006;28(8):799-808. doi: 10.1002/bies.20441

24. Nosanchuk JD, Casadevall A. **Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3519-28. doi: 10.1128/AAC.00545-06
25. Rosa LH, Almeida Vieira Mde L, Santiago IF, Rosa CA. **Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica.** *FEMS Microbiol Ecol.* 2010;73(1):178-89. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00872.x
26. Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. **Dishwashers--a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens.** *Fungal Biol.* 2011;115(10):997-1007. doi: 10.1016/j.funbio.2011.04.007
27. Salas SD, Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Williamson PR. **Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*.** *J Exp Med.* 1996;184(2):377-86. doi: 10.1084/jem.184.2.377
28. Wang M, Zhu J, Lubman DM, Gao C. **Aberrant glycosylation and cancer biomarker discovery: a promising and thorny journey.** *Clin Chem Lab Med.* 2019;57(4):407-416. doi:10.1515/cclm-2018-0379
29. An HJ, Froehlich JW, Lebrilla CB. **Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins.** *Curr Opin Chem Biol.* 2009;13(4):421-426. doi:10.1016/j.cbpa.2009.07.022
30. Sethuraman N, Stadheim TA. **Challenges in therapeutic glycoprotein production.** *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17(4):341-346. doi:10.1016/j.copbio.2006.06.010
31. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. **Glycosylation in health and disease.** *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(6):346-366. doi:10.1038/s41581-019-0129-4
32. Parekh RB, Rohlf C. **Post-translational modification of proteins and the discovery of new medicine.** *Curr Opin Biotechnol.* 1997;8(6):718-723. doi:10.1016/S0958-1669(97)80126-7
33. Wells L, Vosseller K, Hart GW. **Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc.** *Science (80- ).* 2001;291(5512):2376-2378. doi:10.1126/science.1058714
34. Lu Q, Li S, Shao F. **Sweet Talk: Protein Glycosylation in Bacterial Interaction With the Host.** *Trends Microbiol.* 2015;23(10):630-641. doi:10.1016/j.tim.2015.07.003
35. Wacker M, Linton D, Hitchen PG, et al. **N-Linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni* and Its Functional Transfer into *E. coli*.** *Science (80- ).* 2002;298(5599):1790-1793. doi:10.1126/science.298.5599.1790

36. Szymanski CM, Yao R, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P. **Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*.** *Mol Microbiol.* 1999;32(5):1022-1030. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01415.x
37. Schirm M, Soo EC, Aubry AJ, Austin J, Thibault P, Logan SM. **Structural, genetic and functional characterization of the flagellin glycosylation process in *Helicobacter pylori*.** *Mol Microbiol.* 2003;48(6):1579-1592. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03527.x
38. Schoenhofen IC, McNally DJ, Vinogradov E, et al. **Functional Characterization of Dehydratase/Aminotransferase Pairs from *Helicobacter* and *Campylobacter*.** *J Biol Chem.* 2006;281(2):723-732. doi:10.1074/jbc.M511021200
39. Dell A, Galadari A, Sastre F, Hitchen P. **Similarities and Differences in the Glycosylation Mechanisms in Prokaryotes and Eukaryotes.** *Int J Microbiol.* 2010;2010:1-14. doi:10.1155/2010/148178
40. Hassan S, Donia A, Sial U, Zhang X, Bokhari H. **Glycoprotein- and Lectin-Based Approaches for Detection of Pathogens.** *Pathogens.* 2020;9(9):694. doi:10.3390/pathogens9090694
41. Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G. **The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens.** *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(3):382-403. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x
42. Samuel G, Reeves P. **Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly.** *Carbohydr Res.* 2003;338(23):2503-2519. doi:10.1016/j.carres.2003.07.009
43. Gornik O, Pavić T, Lauc G. **Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins — Implications on evolution and disease.** *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2012;1820(9):1318-1326. doi:10.1016/j.bbagen.2011.12.004
44. Lemjabbar-Alaoui H, McKinney A, Yang Y-W, Tran VM, Phillips JJ. **Glycosylation Alterations in Lung and Brain Cancer.** *Adv Cancer Res.* 2015;126:305-344. doi:10.1016/bs.acr.2014.11.007
45. Pu Q, Yu C. **Glycosyltransferases, glycosylation and atherosclerosis.** *Glycoconj J.* 2014;31(9):605-611. doi:10.1007/s10719-014-9560-8
46. Vaidyanathan K, Wells L. **Multiple Tissue-specific Roles for the O-GlcNAc Post-translational Modification in the Induction of and Complications Arising from Type II Diabetes.** *J Biol Chem.* 2014;289(50):34466-34471. doi:10.1074/jbc.R114.591560
47. Zhu Y, Groth T, Kelkar A, Zhou Y, Neelamegham S. **A GlycoGene CRISPR-Cas9 lentiviral library to study lectin binding and human glycan biosynthesis pathways.** *Glycobiology.* 2021;31(3):173-180. doi:10.1093/glycob/cwaa074

48. Starr MP, Chatterjee AK. **The Genus *Erwinia*: Enterobacteria Pathogenic to Plants and Animals.** *Annu Rev Microbiol.* 1972;26(1):389-426. doi:10.1146/annurev.mi.26.100172.002133
49. Weidenmaier C, Peschel A, Xiong Y, et al. **Lack of Wall Teichoic Acids in *Staphylococcus aureus* Leads to Reduced Interactions with Endothelial Cells and to Attenuated Virulence in a Rabbit Model of Endocarditis.** *J Infect Dis.* 2005;191(10):1771-1777. doi:10.1086/429692
50. Cipolla L, Polissi A, Airoidi C, Gabrielli L, Merlo S, Nicotra F. **New Targets for Antibacterial Design: Kdo Biosynthesis and LPS Machinery Transport to the Cell Surface.** *Curr Med Chem.* 2011;18(6):830-852. doi:10.2174/092986711794927676
51. Horzempa J, Held TK, Cross AS, et al. **Immunization with a *Pseudomonas aeruginosa* 1244 Pilin Provides O-Antigen-Specific Protection.** *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(4):590-597. doi:10.1128/CVI.00476-07
52. Hartley MD, Morrison MJ, Aas FE, Børud B, Koomey M, Imperiali B. **Biochemical Characterization of the O-Linked Glycosylation Pathway in *Neisseria gonorrhoeae* Responsible for Biosynthesis of Protein Glycans Containing N , N '-Diacetylbacillosamine.** *Biochemistry.* 2011;50(22):4936-4948. doi:10.1021/bi2003372
53. Hopf PS, Ford RS, Zebian N, et al. **Protein Glycosylation in *Helicobacter pylori*: Beyond the Flagellins?** *PLoS One.* 2011;6(9):e25722. doi:10.1371/journal.pone.0025722
54. Goon S, Kelly JF, Logan SM, Ewing CP, Guerry P. **Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene.** *Mol Microbiol.* 2003;50(2):659-671. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03725.x
55. Sharon N. **History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.** *Glycobiology.* 2004;14(11):53R-62R. doi:10.1093/glycob/cwh122
56. Sumner JB, Howell SF. **Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A.** *J Bacteriol.* 1936;32(2):227-237. doi:10.1128/jb.32.2.227-237.1936
57. Santos AFS, Silva MDC, Napoleao TH, Paiva PMG, Correia MTS, Coelho LCBB. **Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications.** *Curr. Top. Pept. Protein Res.* 2014; 15: 41-62.
58. Maverakis E, Kim K, Shimoda M, et al. **Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review.** *J Autoimmun.* 2015;57:1-13. doi:10.1016/j.jaut.2014.12.002
59. Lakhtin V, Lakhtin M, Alyoshkin V. **Lectins of living organisms. The overview.** *Anaerobe.* 2011;17(6):452-455. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.06.004

60. Zeng X, Andrade CAS, Oliveira MDL, Sun X-L. **Carbohydrate–protein interactions and their biosensing applications.** *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(10):3161-3176. doi:10.1007/s00216-011-5594-y
61. Hendrickson OD, Zherdev A V. **Analytical Application of Lectins.** *Crit Rev Anal Chem.* 2018;48(4):279-292. doi:10.1080/10408347.2017.1422965
62. Peumans WJ, Van Damme EJM. **Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology.** *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 1998; 15:1, 199-228. doi: 10.1080/02648725.1998.10647956
63. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. **Section 11.4 Lectins Are Specific Carbohydrate-Binding Proteins Biochemistry.** 5th ed. W. H. Freeman; New York, NY, USA: 2002.; pp. 1–3.
64. De Schutter K, Van Damme E. **Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity.** *Molecules.* 2015;20(5):9029-9053. doi:10.3390/molecules20059029
65. Feizi T, Haltiwanger RS. **Editorial overview: Carbohydrate–protein interactions and glycosylation: Glycan synthesis and recognition: finding the perfect partner in a sugar-coated life.** *Curr Opin Struct Biol.* 2015;34:vii-ix. doi:10.1016/j.sbi.2015.10.005
66. Lis H, Sharon N. **Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition.** *Chem Rev.* 1998;98(2):637-674. doi:10.1021/cr940413g
67. Wu AM, Wu JH, Tsai M-S, Yang Z, Sharon N, Herp A. **Differential affinities of Erythrina cristagalli lectin (ECL) toward monosaccharides and polyvalent mammalian structural units.** *Glycoconj J.* 2007;24(9):591-604. doi:10.1007/s10719-007-9063-y
68. Ashford D, Dwek RA, Welply JK, et al. **The beta1 2-d-xylose and alpha1 3-l-fucose substituted N-linked oligosaccharides from Erythrina cristagalli lectin. Isolation, characterisation and comparison with other legume lectins.** *Eur J Biochem.* 1987;166(2):311-320. doi:10.1111/j.1432-1033.1987.tb13516.x
69. Stillmark H. Ph.D. Thesis. **Über Ricin, ein Giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und Einigen Anderen Euphorbiaceen.** University of Dorpat; Dorpat, Estonia: 1888.
70. Akimoto Y, Kawakami H. **Histochemical Staining Using Lectin Probes.** *Methods Mol Biol.* 2014; 1200:153-163. doi:10.1007/978-1-4939-1292-6\_14
71. Totten SM, Kullolli M, Pitteri SJ. **Multi-Lectin Affinity Chromatography for Separation, Identification, and Quantitation of Intact Protein Glycoforms in Complex Biological Mixtures.** In: Comai L, Katz J, Mallick P. *Proteomics. Methods in Molecular Biology.* Vol 1550, Humana Press, New York, NY. 2017;99-113. doi:10.1007/978-1-4939-6747-6\_9

- 
72. Kumar Kk, Reddy Gs, Reddy B, Shekar Pc, Sumanthi J, Chandra KIP. **Biological role of lectins: A review.** *J Orofasc Sci.* 2012;4(1):20. doi:10.4103/0975-8844.99883
73. Vishweshwaraiah YL, Prakash B, Gowda LR. **Expression profiling of the Dolichos lablab lectin during germination and development of the seed.** *Plant Physiol Biochem.* 2018;124:10-19. doi:10.1016/j.plaphy.2017.12.040
74. Van Holle S, Van Damme EJM. **Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond.** *Biochem Soc Trans.* 2018;46(2):217-233. doi:10.1042/BST20170371
75. Esch L, Schaffrath U. **An Update on Jacalin-Like Lectins and Their Role in Plant Defense.** *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1592. doi:10.3390/ijms18071592
76. Meyer A, Rypniewski W, Szymański M, Voelter W, Barciszewski J, Betzel C. **Structure of mistletoe lectin I from Viscum album in complex with the phytohormone zeatin.** *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2008;1784(11):1590-1595. doi:10.1016/j.bbapap.2008.07.010
77. Karimi J, Allahyari M, R. A. **Lectins and Their Roles in Pests Control.** In: *New Perspectives in Plant Protection.* InTech; 2012. doi:10.5772/39377
78. Procópio TF, de Siqueira Patriota LL, de Moura MC, et al. **CasuL: A new lectin isolated from Calliandra surinamensis leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect.** *Int J Biol Macromol.* 2017;98:419-429. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.02.019
79. Müller WE, Renneisen K, Kreuter MH, Schröder HC, Winkler I. **The D-mannose-specific lectin from Gerardia savaglia blocks binding of human immunodeficiency virus type I to H9 cells and human lymphocytes in vitro.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1988; 1(5):453-8. PMID: 2906092.
80. Swanson MD, Winter HC, Goldstein IJ, Markovitz DM. **A Lectin Isolated from Bananas Is a Potent Inhibitor of HIV Replication.** *J Biol Chem.* 2010;285(12):8646-8655. doi:10.1074/jbc.M109.034926
81. Keyaerts E, Vijgen L, Pannecouque C, et al. **Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle.** *Antiviral Res.* 2007;75(3):179-187. doi:10.1016/j.antiviral.2007.03.003
82. Przybyło M, Hoja-Lukowicz D, Lityńska A, Laidler P. **Different glycosylation of cadherins from human bladder non-malignant and cancer cell lines.** *Cancer Cell Int.* 2002;2(1):6. doi:10.1186/1475-2867-2-6
83. Varki A, Kannagi R, Toole BP. **Glycosylation Changes in Cancer.** In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology.* 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 44.
-

- 
84. Bhutia SK, Panda PK, Sinha N, et al. **Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death.** *Pharmacol Res.* 2019;144:8-18. doi:10.1016/j.phrs.2019.04.001
85. Balzarini J. **Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins.** *Antiviral Res.* 2006;71(2-3):237-247. doi:10.1016/j.antiviral.2006.02.004
86. Sharon N, Lis H. **Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins.** *Science (80- ).* 1972;177(4053):949-959. doi:10.1126/science.177.4053.949
87. Lam SK, Ng TB. **Lectins: production and practical applications.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;89(1):45-55. doi:10.1007/s00253-010-2892-9
88. Morgan WT, Watkins WM. **The inhibition of the haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars.** *Br J Exp Pathol.* 1953;34(1):94-103
89. Van Damme EJ, Lannoo N, Fouquaert E, Peumans WJ. **The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins.** *Glycoconj J.* 2004;20(7-8):449-60. doi: 10.1023/B:GLYC.0000038291.67527.a5
90. Van Damme EJM. **History of Plant Lectin Research.** *Methods Mol Biol.* 2014;1200:3-13. doi:10.1007/978-1-4939-1292-6\_1
91. Lannoo N, Van Damme EJM. **Lectin domains at the frontiers of plant defense.** *Front Plant Sci.* 2014;5. doi:10.3389/fpls.2014.00397
92. Kumar K, Reddy G, Reddy B, Shekar P, Sumanthi J, Chandra KLP. **Biological role of lectins: A review.** *J. Orofac. Sci.* 2012;4:20-25. doi: 10.4103/0975-8844.99883
93. Martínez-Alarcón D, Blanco-Labra A, García-Gasca T. **Expression of Lectins in Heterologous Systems.** *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):616. doi:10.3390/ijms19020616
94. De Bolle MFC, David KMM, Rees SB, Vanderleyden J, Cammue BPA, Broekaert WF. **Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial chitin-binding protein from amaranth, *Amaranthus caudatus*.** *Plant Mol Biol.* 1993;22(6):1187-1190. doi:10.1007/BF00028991
95. Peumans WJ, Van Damme E. **Lectins as Plant Defense Proteins.** *Plant Physiol.* 1995;109(2):347-352. doi:10.1104/pp.109.2.347
96. Damme EJM Van, Peumans WJ, Barre A, Rougé P. **Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles.** *CRC Crit Rev Plant Sci.* 1998;17(6):575-692. doi:10.1080/07352689891304276
97. Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ. **Plant Lectins.** In: Kader JC, Delseny M. *Advances in Botanical Research.* Academic Press. Vol 48, 2008:107-209. doi:10.1016/S0065-2296(08)00403-5
-

- 
98. Gabius H-J, André S, Jiménez-Barbero J, Romero A, Solís D. **From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code.** *Trends Biochem Sci.* 2011;36(6):298-313. doi:10.1016/j.tibs.2011.01.005
99. Lebed K, Kulik AJ, Forró L, Lekka M. **Lectin-carbohydrate affinity measured using a quartz crystal microbalance.** *J Colloid Interface Sci.* 2006;299(1):41-48. doi:10.1016/j.jcis.2006.01.053
100. Doyle R, ed. **Lectin-Microorganism Interactions.** CRC Press; 1994. doi:10.1201/9781482277548
101. Rini JM. **Lectin Structure.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1995;24(1):551-577. doi:10.1146/annurev.bb.24.060195.003003
102. Weis WI, Drickamer K. **Structural basis of lectin-carbohydrate recognition.** *Annu Rev Biochem.* 1996;65(1):441-473. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.002301
103. Perçin I, Yavuz H, Aksöz E, Denizli A. **Mannose-specific lectin isolation from *Canavalia ensiformis* seeds by PHEMA-based cryogel.** *Biotechnol Prog.* 2012;28(3):756-761. doi:10.1002/btpr.1552
104. Howard IK, Sage HJ, Stein MD, Young NM, Leon MA, Dyckes DF. **Studies on a Phytohemagglutinin from the Lentil.** *J Biol Chem.* 1971;246(6):1590-1595. doi:10.1016/S0021-9258(18)62353-1
105. Chacko BK, Appukuttan PS. **Peanut (*Arachis hypogaea*) lectin recognizes  $\alpha$ -linked galactose, but not N-acetyl lactosamine in N-linked oligosaccharide terminals.** *Int J Biol Macromol.* 2001;28(5):365-371. doi:10.1016/S0141-8130(01)00139-8
106. Harley SM, Beevers H. **Lectins in Castor Bean Seedlings.** *Plant Physiol.* 1986;80(1):1-6. doi:10.1104/pp.80.1.1
107. Holthöfer H, Virtanen I, Kariniemi AL, Hormia M, Linder E, Miettinen A. ***Ulex europaeus* I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues.** *Lab Invest.* 1982;47(1):60-66.
108. Konami Y, Yamamoto K, Osawa T, Irimura T. **Strong affinity of *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) for sialic acid-containing Ser/Thr-linked carbohydrate chains of N-terminal octapeptides from human glycophorin A.** *FEBS Lett.* 1994;342(3):334-338. doi:10.1016/0014-5793(94)80527-X
109. Dan X, Liu W, Ng TB. **Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research.** *Med Res Rev.* 2016;36(2):221-247. doi:10.1002/med.21363
110. Imberty A, Gautier C, Lescar J, Perez S, Wyns L, Loris R. **An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia***
-

- amurensis lectins complexed with scialic acid – containing oligosaccharides.** *J Biol Chem.* 2000;275(23): 17541-17548. doi:10.1074 /jbc.M000560200.
111. Pan L, Hamdy Farouk M, Qin G, Zhao Y, Bao N. **The Influences of Soybean Agglutinin and Functional Oligosaccharides on the Intestinal Tract of Monogastric Animals.** *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):554. doi: 10.3390/ijms19020554
112. Foriers A, Lebrun E, Van Rapenbusch R, de Neve Rm Strosberg A D. **The structure of the lentil (*Lens culinaris*) lectin. Amino acid sequence determination and prediction of the secondary structure.** *J Biol Chem.* 1981;256(11):5550-5560. PMID: 7240155.
113. Nagata Y, Burger MM. **Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding.** *J Biol Chem.* 1974;249(10):3116-22. PMID: 4830237.
114. Lin TT, Li SL. **Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis*.** *Eur J Biochem.* 1980;105(3):453-9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1980.tb04520.x.
115. Edelman GM, Wang JL. **Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands.** *J Biol Chem.* 1978;253(9):3016-22. PMID: 641053.
116. Mach L, Scherf W, Ammann M, Poetsch J, Bertsch W, März L, Glössl J. **Purification and partial characterization of a novel lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) fruit.** *Biochem J.* 1991;278:667-71. doi: 10.1042/bj2780667.
117. Singh SS, Devi SK, Ng TB. **Banana lectin: a brief review.** *Molecules.* 2014;19(11):18817-27. doi: 10.3390/molecules191118817
118. Law JW-F, Ab Mutalib N-S, Chan K-G, Lee L-H. **Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations.** *Front Microbiol.* 2015;5. doi:10.3389/fmicb.2014.00770
119. Byrne B, Stack E, Gilmartin N, O’Kennedy R. **Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins.** *Sensors.* 2009;9(6):4407-4445. doi:10.3390/s90604407
120. Ferreira AP, Werneck MM, Ribeiro RM, Lins UG. **Pathogen detection using evanescent-wave fiber optic biosensor;** In: Glass AJ, Goodman JW, Chang M, Guenther AH, Asakura T, eds. ; 1999:395-396. doi:10.1117/12.354802
121. Ilic B, Yang Y, Craighead HG. **Virus detection using nanoelectromechanical devices.** *Appl Phys Lett.* 2004;85(13):2604-2606. doi:10.1063/1.1794378
122. Kuznetsov YG, Gurnon JR, Van Etten JL, McPherson A. **Atomic force microscopy investigation of a chlorella virus, PBCV-1.** *J Struct Biol.* 2005;149(3):256-263. doi:10.1016/j.jsb.2004.10.007

- 
123. Jelinek R, Kolusheva S. **Carbohydrate biosensors.** *Chem Rev.* 2004;104(12):5987-6015. doi: 10.1021/cr0300284.
124. Laughlin ST, Bertozzi CR. **Imaging the glycome.** *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(1):12-17. doi:10.1073/pnas.0811481106
125. Masarova J, Dey ES, Danielsson B. **Optical lectin based biosensor as tool for bacteria identification.** *Polish J Microbiol.* 2004;53 Suppl:23-27.
126. Calderon AM, Buck G, Doyle R J. **Lectin-microorganism complexes.** *Lectins, biology, biochemistry, clinical biochemistry,* 1997; 12.
127. Fulton KM, Smith JC, Twine SM. **Clinical applications of bacterial glycoproteins.** *Expert Rev Proteomics.* 2016;13(4):345-353. doi:10.1586/14789450.2016.1166054
128. Brooks SA. **Lectin Histochemistry: Historical Perspectives, State of the Art, and the Future.** In: Pellicciari C, Biggiogera M. *Histochemistry of Single Molecules. Methods in Molecular biology.* Humana Press, New York, NY. Vol 1560, 2017:93-107. doi:10.1007/978-1-4939-6788-9\_6
129. Hirabayashi J, Kuno A, Tateno H. **Development and Applications of the Lectin Microarray.** *Top Curr Chem.* 2015;367:105-124. doi:10.1007/128\_2014\_612
130. Hirabayashi J, Kuno A, Tateno H. **Lectin-based structural glycomics: A practical approach to complex glycans.** *Electrophoresis.* 2011;32(10):1118-1128. doi:10.1002/elps.201000650
131. Van Breedam W, Pöhlmann S, Favoreel HW, de Groot RJ, Nauwynck HJ. **Bitter-sweet symphony: glycan-lectin interactions in virus biology.** *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(4):598-632. doi:10.1111/1574-6976.12052
132. Wu AM, Song S-C, Chang S-C, Wu JH, Chang KSS, Kabat EA. **Further characterization of the binding properties of a GalNAc specific lectin from *Codium fragile* subspecies *tomentosoides*.** *Glycobiology.* 1997;7(8):1061-1066. doi:10.1093/glycob/7.8.1061
133. Duk M, Lisowska E, Kordowicz M, Wasniowska K. **Studies on the Specificity of the Binding Site of *Vicia graminea* Anti-N Lectin.** *Eur J Biochem.* 1982;123(1):105-112. doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb06505.x
134. Sano K, Ogawa H. **Hemagglutination (Inhibition) Assay.** In: Hirabayashi J. *Lectins. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols).* Humana Press, New York, NY. Vol 1200, 2014:47-52. doi:10.1007/978-1-4939-1292-6\_4
135. Maupin KA, Liden D, Haab BB. **The fine specificity of mannose-binding and galactose-binding lectins revealed using outlier motif analysis of glycan array data.** *Glycobiology.* 2012;22(1):160-169. doi:10.1093/glycob/cwr128
-

136. Hirabayashi J, Tateno H, Shikanai T, Aoki-Kinoshita K, Narimatsu H. **The Lectin Frontier Database (LfDB), and Data Generation Based on Frontal Affinity Chromatography.** *Molecules.* 2015;20(1):951-973. doi:10.3390/molecules20010951
137. Syed P, Gidwani K, Kekki H, Leivo J, Pettersson K, Lamminmäki U. **Role of lectin microarrays in cancer diagnosis.** *Proteomics.* 2016;16(8):1257-1265. doi:10.1002/pmic.201500404
138. Donnelly EH, Goldstein IJ. **Glutaraldehyde-insolubilized concanavalin A: an adsorbent for the specific isolation of polysaccharides and glycoproteins.** *Biochem J.* 1970;118(4):679-680. doi:10.1042/bj1180679
139. Sumi S, Arai K, Kitahara S, Yoshida K. **Serial lectin affinity chromatography demonstrates altered asparagine-linked sugar-chain structures of prostate-specific antigen in human prostate carcinoma.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999;727(1-2):9-14. doi:10.1016/S0378-4347(99)00069-9
140. Alroy J, Orgad U, Ucci AA, Pereira ME. **Identification of glycoprotein storage diseases by lectins: a new diagnostic method.** *J Histochem Cytochem.* 1984;32(12):1280-1284. doi:10.1177/32.12.6501863
141. Roth J. **Lectins for histochemical demonstration of glycans.** *Histochem Cell Biol.* 2011;136(2):117-130. doi:10.1007/s00418-011-0848-5
142. Nakajima M. **Immuno and Lectin Histochemistry for Renal Electron Microscopy.** In: ; 2009:149-159. doi:10.1007/978-1-59745-352-3\_11
143. Onuma Y, Tateno H, Tsuji S, Hirabayashi J, Ito Y, Asashima M. **A Lectin-Based Glycomic Approach to Identify Characteristic Features of Xenopus Embryogenesis.** *PLoS One.* 2013;8(2):e56581. doi:10.1371/journal.pone.0056581
144. Morgan GW, Kail M, Hollinshead M, Vaux DJ. **Combined biochemical and cytological analysis of membrane trafficking using lectins.** *Anal Biochem.* 2013;441(1):21-31. doi:10.1016/j.ab.2013.05.034
145. Angeloni S. **Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins.** *Glycobiology.* 2004;15(1):31-41. doi:10.1093/glycob/cwh143
146. Pilobello KT, Krishnamoorthy L, Slawek D, Mahal LK. **Development of a Lectin Microarray for the Rapid Analysis of Protein Glycopatterns.** *ChemBioChem.* 2005;6(6):985-989. doi:10.1002/cbic.200400403
147. Zheng T, Peelen D, Smith LM. **Lectin Arrays for Profiling Cell Surface Carbohydrate Expression.** *J Am Chem Soc.* 2005;127(28):9982-9983. doi:10.1021/ja0505550
148. Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, et al. **Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling.** *Nat Methods.* 2005;2(11):851-856. doi:10.1038/nmeth803

- 
149. Hsu K-L, Pilobello KT, Mahal LK. **Analyzing the dynamic bacterial glycome with a lectin microarray approach.** *Nat Chem Biol.* 2006;2(3):153-157. doi:10.1038/nchembio767
150. Hsu K-L, Mahal LK. **A lectin microarray approach for the rapid analysis of bacterial glycans.** *Nat Protoc.* 2006;1(2):543-549. doi:10.1038/nprot.2006.76
151. Koshi Y, Nakata E, Yamane H, Hamachi I. **A Fluorescent Lectin Array Using Supramolecular Hydrogel for Simple Detection and Pattern Profiling for Various Glycoconjugates.** *J Am Chem Soc.* 2006;128(32):10413-10422. doi:10.1021/ja0613963
152. Ebe Y, Kuno A, Uchiyama N, et al. **Application of Lectin Microarray to Crude Samples: Differential Glycan Profiling of Lec Mutants.** *J Biochem.* 2006;139(3):323-327. doi:10.1093/jb/mvj070
153. Tateno H, Uchiyama N, Kuno A, et al. **A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray.** *Glycobiology.* 2007;17(10):1138-1146. doi:10.1093/glycob/cwm084
154. Rosenfeld R, Bangio H, Gerwig GJ, et al. **A lectin array-based methodology for the analysis of protein glycosylation.** *J Biochem Biophys Methods.* 2007;70(3):415-426. doi:10.1016/j.jbbm.2006.09.008
155. Xin A-J, Cheng L, Diao H, et al. **Comprehensive profiling of accessible surface glycans of mammalian sperm using a lectin microarray.** *Clin Proteomics.* 2014;11(1):10. doi:10.1186/1559-0275-11-10
156. Nand A, Singh V, Wang P, Na J, Zhu J. **Glycoprotein profiling of stem cells using lectin microarray based on surface plasmon resonance imaging.** *Anal Biochem.* 2014;465:114-120. doi:10.1016/j.ab.2014.07.028
157. Yasuda E, Sako T, Tateno H, Hirabayashi J. **Application of Lectin Microarray to Bacteria Including *Lactobacillus casei/paracasei* Strains.** *Methods Mol Biol.* 2014; 1200:295-311. doi:10.1007/978-1-4939-1292-6\_25
158. Shibazaki A, Gono T. **Lectin-Microarray Technique for Glycomic Profiling of Fungal Cell Surfaces.** *Methods Mol Biol.* 2014; 1200:287-294. doi:10.1007/978-1-4939-1292-6\_24
159. Inoue K, Wada J, Eguchi J, et al. **Urinary Fetuin-A Is a Novel Marker for Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes Identified by Lectin Microarray.** *PLoS One.* 2013;8(10):e77118. doi:10.1371/journal.pone.0077118
160. Nakajima K, Inomata M, Iha H, et al. **Establishment of new predictive markers for distant recurrence of colorectal cancer using lectin microarray analysis.** *Cancer Med.* 2015;4(2):293-302. doi:10.1002/cam4.342
-

161. Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, et al. **Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells.** *Genes to Cells*. 2011;16(1):1-11. doi:10.1111/j.1365-2443.2010.01459.x
162. Krishnamoorthy L, Bess JW, Preston AB, Nagashima K, Mahal LK. **HIV-1 and microvesicles from T cells share a common glycome, arguing for a common origin.** *Nat Chem Biol*. 2009;5(4):244-250. doi:10.1038/nchembio.151
163. Park S, Shin I. **Fabrication of Carbohydrate Chips for Studying Protein - Carbohydrate Interactions.** *Angew Chemie*. 2002;114(17):3312-3314. doi:10.1002/1521-3757(20020902)114:17<3312::AID-ANGE3312>3.0.CO;2-K
164. Blixt O, Head S, Mondala T, et al. **Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins.** *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(49):17033-17038. doi:10.1073/pnas.0407902101
165. Mehrotra P. **Biosensors and their applications - A review.** *J Oral Biol Craniofac Res*. 2016;6(2):153-159. doi:10.1016/j.jobcr.2015.12.002
166. Hamachi I, Nagase T, Shinkai S. **A General Semisynthetic Method for Fluorescent Saccharide-Biosensors Based on a Lectin.** *J Am Chem Soc*. 2000;122(48):12065-12066. doi:10.1021/ja002044d
167. Dai Z, Kawde A-N, Xiang Y, et al. **Nanoparticle-Based Sensing of Glycan-Lectin Interactions.** *J Am Chem Soc*. 2006;128(31):10018-10019. doi:10.1021/ja063565p
168. La Belle JT, Gerlach JQ, Svarovsky S, Joshi L. **Label-Free Impedimetric Detection of Glycan-Lectin Interactions.** *Anal Chem*. 2007;79(18):6959-6964. doi:10.1021/ac070651e
169. Tam K, Kinsinger N, Ayala P, Qi F, Shi W, Myung NV. **Real-Time Monitoring of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation Using a Quartz Crystal Microbalance.** *Caries Res*. 2007;41(6):474-483. doi:10.1159/000108321
170. Wang Y, Ye Z, Si C, Ying Y. **Monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor.** *Food Chem*. 2013;136(3-4):1303-1308. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.069
171. Zhang X, Teng Y, Fu Y, et al. **Lectin-Based Biosensor Strategy for Electrochemical Assay of Glycan Expression on Living Cancer Cells.** *Anal Chem*. 2010;82(22):9455-9460. doi:10.1021/ac102132p
172. Goodarzi MT, Turner GA. **A lectin method for investigating the glycosylation of nanogram amounts of purified glycoprotein.** *Glycoconj J*. 1997;14(4):493-496. doi:10.1023/A:1018507703589
173. Singh T, Wu JH, Peumans WJ, Rouge P, Van Dammer EJ, Alvarez RA, Blixt O, Wu AM. **Carbohydrate specificity of an insecticidal lectin isolated from the**

- leaves of *Glechoma hederacea* (ground ivy) towards mammalian glycoconjugates. *Biochem J.* 2006;393(Pt1):331-341. doi: 10.1042/BJ20051162
174. Wu AM, Wu JH, Herp A, Liu JH. **Effect of polyvalencies of glycotops on the binding of a lectin from the edible mushroom, *Agaricus bisporus*.** *Biochem J.* 2003;371(Pt 2):311-320. doi: 10.1042/BJ20021361
175. Duk M, Lisowska E, Wu JH, Wu AM. **The Biotin/Avidin-Mediated Microtiter Plate Lectin Assay with the Use of Chemically Modified Glycoprotein Ligand.** *Anal Biochem.* 1994;221(2):266-272. doi:10.1006/abio.1994.1410
176. Hendrickson OD, Smirnova NI, Zherdev A V., Gasparyan VK, Dzantiev BB. **Enzyme-linked lectinosorbent assay of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.** *Appl Biochem Microbiol.* 2017;53(1):107-113. doi:10.1134/S0003683817010082
177. Sauerbrey G. **The use of quartz oscillators for weighting thin layers and for microweighting.** *Zeitschrift fur Physik.* 1959;155(2), 206-222. doi: 10.1007/BF01337937
178. Kalograiaki I, Campanero-Rhodes MA, Proverbio D, Euba B, Garmendia J, Aastrup T, Solís D. **Bacterial Surface Glycans: Microarray and QCM Strategies for Glycophenotyping and Exploration of Recognition by Host Receptors.** *Methods Enzymol.* 2018;598:37-70. doi: 10.1016/bs.mie.2017.06.011.
179. Gavrovic-Jankulovic M, Poulsen K, Brckalo T, Bobic S, Lindner B, Petersen A. **A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs.** *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(5):929-941. doi:10.1016/j.biocel.2007.10.033
180. Minić R, Papić Z, Đorđević B, et al. **Profiling of microorganism-binding serum antibody specificities in professional athletes.** *PLoS One.* 2018;13(9):e0203665. doi:10.1371/journal.pone.0203665
181. Brown GD, Gordon S. **Immune recognition of fungal beta-glucans.** *Cell Microbiol.* 2005;7(4):471-479. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00505.x.
182. Snarr BD, Qureshi ST, Sheppard DC. **Immune Recognition of Fungal Polysaccharides.** *Journal of Fungi.* 2017; 3(3):47. doi:10.3390/jof3030047
183. Bain JM, Louw J, Lewis LE, Okai B, Walls CA, Ballou ER, Walker LA, Reid D, Munro CA, Brown AJ, Brown GD, Gow NA, Erwig LP. **Candida albicans hypha formation and mannan masking of  $\beta$ -glucan inhibit macrophage phagosome maturation.** *MBio.* 2014;5(6). doi:10.1128/mBio.01874-14
184. Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, Hobson RP, Bertram G, Hughes HB, Jansen T, Jacobs L, Buurman ET, Gijzen K, Williams DL,

- Torensma R, McKinnon A, MacCallum DM, Odds FC, Van der Meer JW, Brown AJ, Kullberg BJ. **Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and toll-like receptors.** *J. Clin. Invest.* 2006. doi:10.1172/JCI27114
185. Mo H, Winter HC, Van Damme EJM, Peumans WJ, Misaki A, Goldstein IJ. **Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin.** *Eur J Biochem.* 2001;268(9):2609-2615. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02148.x
186. Goldstein IJ, Winter HC, Mo H, Misaki A, Van Damme EJM, Peumans WJ. **Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin.** *Eur J Biochem.* 2001;268(9):2616-2619. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.02149.x
187. Yasuda E, Tateno H, Hirabayashi J, Inob T, Sako T. **Lectin microarray reveals binding profiles of *Lactobacillus casei* strains in a comprehensive analysis of bacterial cell wall polysaccharides.** *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77(13). doi:10.1128/AEM.00240-11
188. Balzaretto S, Taverniti V, Guglielmetti S, Fiore W, Minuzzo M, Ngo HN, Ngere JB, Sadoq S, Humphreys PN, Laws AP. **A novel Rhamnose-rich hetero-exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus paracasei* DG activates THP-1 human Monocytic cells.** *Appl. Environ. Microbiol.* 2017;83(3) doi:10.1128/AEM.02702-16
189. **European Medicines Agency (2005) Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology.** [[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)]
190. Dragacevic L, Djordjevic B, Gavrovic-Jankulovic M, Ilic V, Kanazir D, Minic R. **ELLSA based profiling of surface glycosylation in microorganisms reveals that  $\beta$ -glucan rich yeasts' surfaces are selectively recognized with recombinant banana lectin.** *Glycoconj J.* 2020;37(1):95-105. doi:10.1007/s10719-019-09898-8
191. Peumans WJ, Zhang W, Barre A, et al. **Fruit-specific lectins from banana and plantain.** *Planta.* 2000;211(4):546-554. doi:10.1007/s004250000307
192. Itakura Y, Nakamura-Tsuruta S, Kominami J, Sharon N, Kasai K -i., Hirabayashi J. **Systematic Comparison of Oligosaccharide Specificity of Ricinus communis Agglutinin I and Erythrina Lectins: a Search by Frontal Affinity Chromatography.** *J Biochem.* 2007;142(4):459-469. doi:10.1093/jb/mvm153
193. Tateno H, Mori A, Uchiyama N, et al. **Glycoconjugate microarray based on an evanescent-field fluorescence-assisted detection principle for investigation of glycan-binding proteins.** *Glycobiology.* 2008;18(10):789-798. doi:10.1093/glycob/cwn068

- 
194. Pomin VH. **Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review.** *Glycoconj J.* 2010;27(1):1-12. doi:10.1007/s10719-009-9251-z
195. Aghaeepour N, Finak G. **The FlowCAP Consortium. et al. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques.** *Nat Methods.* 2013;10:228–238. doi:10.1038/nmeth.2365
196. Lopandić Z, Dragačević L, Popović D, Andjelković U, Minić R, Gavrović-Jankulović M. **BanLec-eGFP Chimera as a Tool for Evaluation of Lectin Binding to High-Mannose Glycans on Microorganisms.** *Biomolecules.* 2021;11(2):180. doi:10.3390/biom11020180
197. Devyatyarova-Johnson M, Rees IH, Robertson BD, Turner MW, Klein NJ, Jack DL. **The Lipopolysaccharide Structures of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and *Neisseria gonorrhoeae* Determine the Attachment of Human Mannose-Binding Lectin to Intact Organisms.** *Infect Immun.* 2000;68(7):3894-3899. doi:10.1128/IAI.68.7.3894-3899.2000
198. Bates S, Hughes HB, Munro CA, et al. **Outer Chain N-Glycans Are Required for Cell Wall Integrity and Virulence of *Candida albicans*.** *J Biol Chem.* 2006;281(1):90-98. doi:10.1074/jbc.M510360200
199. Hall RA, Bates S, Lenardon MD, et al. **The Mnn2 Mannosyltransferase Family Modulates Mannoprotein Fibril Length, Immune Recognition and Virulence of *Candida albicans*.** *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003276. doi:10.1371/journal.ppat.1003276
200. Bai C, Xu X-L, Chan F-Y, Lee RTH, Wang Y. **MNN5 Encodes an Iron-Regulated  $\alpha$ -1,2-Mannosyltransferase Important for Protein Glycosylation, Cell Wall Integrity, Morphogenesis, and Virulence in *Candida albicans*.** *Eukaryot Cell.* 2006;5(2):238-247. doi:10.1128/EC.5.2.238-247.2006
201. Zhang SQ, Zou Z, Shen H, et al. **Mnn10 Maintains Pathogenicity in *Candida albicans* by Extending  $\alpha$ -1,6-Mannose Backbone to Evade Host Dectin-1 Mediated Antifungal Immunity.** *PLOS Pathog.* 2016;12(5):e1005617. doi:10.1371/journal.ppat.1005617
202. Freitas M, Tavan E, Cayuela C, Diop L, Sapin C, Trugnan G. **Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game.** *Biol Cell.* 2003;95(8):503-6. doi: 10.1016/j.biocel.2003.08.004.
203. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, Konradsen HB, Nahm MH. **Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future.** *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):871-99. doi: 10.1128/CMR.00024-15.
204. Murray A, Lawrence GP. **How should the repeatability of clinical measurements be analysed? An assessment of analysis techniques with data from**
-

- cardiovascular autonomic function tests.** *QJM An Int J Med.* Published online December 1993. doi:10.1093/oxfordjournals.qjmed.a068767
205. Biddlecombe RA, Law B. **Immunoassay: a Practical Guide.** Taylor & Francis Group, London, UK, 1996.
206. Shang K, Song S, Cheng Y, Guo L, Pei Y, Lv X, Aastrup T, Pei Z. **Fabrication of Carbohydrate Chips Based on Polydopamine for Real-Time Determination of Carbohydrate-Lectin Interactions by QC Biosensor.** *Polymers.* 2018;10(11):1275. doi: 10.3390/polym10111275
207. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. **IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions.** *Front Immunol.* 2014;5:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520
208. Ferrante A, Beard LJ, Feldman RG. **IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens.** *Pediatr Infect Dis J.* 1990;9(8):16–24. doi:10.1097/00006454-199008001-00004
209. Soderstrom T, Enskog A, Samuelsson BE, Cedergren B. **Immunoglobulin subclass (IgG3) restriction of anti-P and anti-Pk antibodies in patients of the rare p blood group.** *J Immunol.* 1985;134(1):1–3.
210. Brown TA, Mestecky J. **Immunoglobulin A subclass distribution of naturally occurring salivary antibodies to microbial antigens.** *Infect Immun.* 1985;49(2):459-462. doi:10.1128/iai.49.2.459-462.1985
211. Zoran Vujčić. **Određivanje koncentracije proteina po Bradford-u.** In: Z, Vujčić. *Eksperimentalna biohemija-praktikum.* 1. Izdanje, Rantec, Beograd. 2002. ISBN 86-83533-09-3
212. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.
213. Zoran Vujčić. **Određivanje koncentracije proteina Lowry-evom metodom.** In: Z, Vujčić. *Eksperimentalna biohemija-praktikum.* 1. Izdanje, Rantec, Beograd. 2002. ISBN 86-83533-09-3
214. Schägger H, von Jagow G. **Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.** *Anal Biochem.* 1987;166(2):368-379. doi:10.1016/0003-2697(87)90587-2
215. Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R. **LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water.** *J Microbiol Methods.* 1999 Jul;37(1):77-86. doi: 10.1016/s0167-7012(99)00048-2. PMID: 10395466.

---

## OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

### 1. Rad objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)

Lopandić Z, Dragačević L, Popović D, Andjelković U, Minić R, Gavrović-Jankulović M. **BanLec-eGFP chimera as a tool for evaluation of lectin binding to high-mannose glycans on microorganisms.** *Biomolecules* 2021; 11(2): 180  
**Kategorija M21: 2020** – Biohemija i molekularna biologija 96/296, IF 4.879  
<https://www.mdpi.com/2218-273X/11/2/180>

### 2. Rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorija M22)

Dragacevic L, Djordjevic B, Gavrovic-Jankulovic M, Ilic V, Kanazir D, Minic R. **ELLSA based profiling of surface glycosylation in microorganisms reveals that  $\beta$ -glucan rich yeasts' surfaces are selectively recognized with recombinant banana lectin.** *Glycoconjugate Journal* 2020; 37(1): 95-105  
**Kategorija M22: 2018** – Biohemija i molekularna biologija 143/299, IF 2.926  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10719-019-09898-8>

### 3. Rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorija M22)

Luka Dragačević, Zorana Lopandić, Marija Gavrović-Jankulović, Irena Živković, Veljko Blagojević, Natalija Polović, Rajna Minić. **Comparison of Enzyme-Linked Lectin Sorbent Assay and Flow Cytometry for Profiling Microbial Glycans.** *Applied biochemistry and biotechnology* 2022; Jan 11  
**Kategorija M22: 2022** – Biotehnologija i primenjena mikrobiologija 88/160, IF 2.926  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-021-03772-w>

---

**4. Saopštenje sa međunarodnog naučnog skupa štampano u izvodu  
(kategorija M34)**

**Dragacevic L, Djordjevic B, Gavrovic-Jankulovic M, Ilic V, Minic R. Typing of surface glycosylation of microorganisms by lectins with in house ELISA.**

Abstract book, page 107. X *Probiotics, prebiotics and New Foods*, 8.-10.

September 2019. Universita Urbaniana, Rome, Italy.

**5. Saopštenje sa međunarodnog naučnog skupa štampano u izvodu  
(kategorija M34)**

**Minić R, Dragačević L, Živković I. Glycan structures found in viral vaccines are largely dependent on the cell type in which viruses are cultivated. 6th European Congress of Immunology (6th ECI 2021) virtually held September 1-4,2021**

---

## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Лука (Владан) Драгачевић рођен је 8. септембра 1986. године у Београду, Република Србија.

Основне академске студије, смер „Молекуларна биологија и физиологија“ на Универзитету у Београду – Биолошки факултет уписао је 2005. године, а дипломирао 2012. године са оценом 10 на дипломском раду „Генетички диверзитет маховине *Atrichum undulatum* у Европи“ (ментори: др Марко Сабовљевић, редовни професор и др Сузана Живковић, виши научни сарадник).

Докторске студије, студијски програм „Биохемија“ на Универзитету у Београду – Хемијски факултет уписао је школске 2014. године. Кандидат је положио све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 10,00 (десет и 100/100).

Специјалистичке академске студије, студијски програм „Биолошки лекови“ на Фармацеутском факултету, Универзитета у Београду уписао је 2017. године, а дипломирао 2018., са оценом 10 и специјалистичким радом „Валидација процеса сплитовања сезонске инактивисане вакцине против грипа“ (ментор: др Невена Арсеновић Ранин, редовни професор).

Од августа 2012. године запослен је у Институту за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“, где ради као сарадник у Одсеку за производњу вакцине против тетануса и где учествује у свим фазама производње и производне контроле. Од 2013. ради као сарадник у Одсеку за производњу вакцине против грипа. На радно место шефа Одсека за производњу вакцине против грипа ступа 2017. године, где ради до 2019. године, на валидацији процеса производње сезонске вакцине против грипа, као и на дефинисању процеса производње пандемијске вакцине против грипа.

У марту 2019. године почиње да ради на месту сарадника у Одсеку за научно-истраживачки рад Института „Торлак“, где се бави имунохемијским испитивањима,

---

---

испитивањем интеракције микроорганизама са имунским системом са фокусом на испитивање површинског гликозиловања микроорганизама уз помоћ биљних лектина.

До сад је објавио седам научних радова у међународним часописима. Имао је пет саопштења на међународним и два на националним научним скуповима.

---

## ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписан            **Лука Драгачевић**

Број индекса        **ДБ12/2014**

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под називом:

**Профилисање површинског гликолизовања микроорганизама биљним лектинима**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација ни у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис докторанда**

\_\_\_\_\_

---

## ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора     **Лука Драгачевић**

Број индекса               **ДБ12/2014**

Студијски програм         **Биохемија**

Наслов рада                **Профилисање површинског гликолизања микроорганизама  
биљним лектинима**

Ментор                      **проф. др Наталија Половић, др Рајна Минић**

Потписани/а               **Лука Драгачевић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис докторанда**

\_\_\_\_\_

---

## ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку "Светозар Марковић" да у дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Профилисање површинског гликолизовања микроорганизама биљним лектинима**  
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду \_\_\_\_\_

**Потпис докторанда**  
\_\_\_\_\_

- 
1. **Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
  2. **Ауторство - некомерцијално**. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
  3. **Ауторство - некомерцијално - без прераде**. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
  4. **Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима**. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
  5. **Ауторство - без прераде**. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
  6. **Ауторство - делити под истим условима**. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.