DOI: 10.53584/wiadchem.2022.1.5

WIADOMOŚCI chemiczne 2022, **76**, 1-2
PL ISSN 0043-5104

CHEMIA BIOORTOGONALNA – UŻYTECZNE NARZĘDZIE BADANIA PROCESÓW WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

BIOORTHOGONAL CHEMISTRY - A USEFUL TOOL FOR STUDYING INTERCELLULAR PROCESSES

Krystian Latos

Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
ul. Gronostajowa 2,
30-387 Kraków
e-mail: krystian.latos@doctoral.uj.edu.pl, krystian.latos97@gmail.com

Abstract
Wprowadzenie
1. Chemia bioortogonalna
  1.1. Ligacja bioortogonalna
2. Zastosowania chemii bioortogonalnej
  2.1. Znakowanie kwasów nukleinowych
    2.1.1. Biotynylowanie DNA
    2.1.2. Fluoryzujące analogi nukleozydów
  2.2. Znakowanie białek
    2.2.1. Badanie wewnątrzcząsteczkowych zmian konformacyjnych
    2.2.2. Śledzenie interakcji między białkami
    2.2.3. Biosensing
  2.3. Znakowanie glikanu
Uwagi końcowe
Piśmiennictwo cytowane

ABSTRACT

Bioorthogonal chemistry is a rapidly developing field of science operating on the border of chemistry and biology. Its initial goal was to study metabolism and imaging using fluorescently labelled compounds. Due to recent advances, bioorthogonal chemistry can also be used to engineer therapeutic bioconjugates. By using a combination of bioconjugation and advanced omics techniques, it is possible to study and modify complex interactions inside living cells.

In the relatively short time since its introduction, bioorthogonal chemistry has found many applications. In nucleic acid research, it is used for labelling, e.g. with biotin, to facilitate detection, immobilization, and purification. Additionally, thanks to the use of fluorescent nucleoside analogues, it can be used to study the interaction and dynamics of nucleic acids. For the study of proteins, bioorthogonal chemistry is an invaluable tool for studying conformation, as well as intramolecular and intermolecular interactions. Using techniques such as PET and FRET it is possible to take a closer look at the structure of proteins, which has a significant impact on their functionality. By using biarsenical dyes, interactions between proteins are tracked. This is used in the study of protein aggregation in diseases such as Alzheimer's, Huntington's, and prion diseases. Thanks to this, it becomes possible to understand the mechanism and pathology of these diseases. In biosensing, the elements of bioorthogonal chemistry have been used in a variety of tests and imaging methods. In the end, methods for testing glycan are presented. The advantage of bioorthogonal methods is that they allow labelling on the whole cell or lysate. This application in glycoproteomics is extremely important due to the fact that changes in glycosylation occur during disease states.

Keywords: bioorthogonal chemistry, bioorthogonal ligation, nucleic acids, proteins, saccharides

Słowa kluczowe: chemia bioortogonalna, ligacja bioortogonalna, kwasy nukleinowe, białka, sacharydy

WPROWADZENIE

XXI wiek to czas wzmożonych prób przeniesienia reakcji chemicznych prowadzonych w laboratorium do środowiska wnętrza komórki. Związki chemiczne oddziałujące na organizmy są tworzone właściwie od początków istnienia nowoczesnej chemii. Jednakże, reakcje chemiczne prowadzące do utworzenia tych związków starano utrzymywać tak daleko jak to tylko możliwe od organizmów. Do przeprowadzenia ich używano, nierzadko toksycznych rozpuszczalników organicznych, natomiast woda, a często również i tlen, nie miały dostępu do mieszaniny reakcyjnej. Jednakże, ciągły rozwój medycyny sprawił, że potrzebna stała się innowacyjna metoda umożliwiająca śledzenie losów leków i biomolekuł wewnątrz organizmu. W rezultacie konieczne stało się stworzenie nowych reakcji organicznych przystosowanych do warunków panujących wewnątrz organizmów – obecności środowiska wodnego, będącego mieszaniną olbrzymiej ilości białek, sacharydów, kwasów nukleinowych, metabolitów i innych składników organicznych i nieorganicznych. Rozwiązaniem problemu prowadzenia reakcji w tak skomplikowanym środowisku stała się, zaproponowana w 2003 roku przez Carolyn Bertozzi i jej współpracowników, tak zwana chemia bioortogonalna [1]. Termin ten obejmuje reakcje zaprojektowane w ten sposób, aby mogły zachodzić wewnątrz komórek żywego organizmu jednocześnie nie wpływając na zachodzące w nich procesy biochemiczne a także na żywotność komórki.

Reakcje odkryte dzięki powstaniu chemii bioortogonalnej mogą zostać wykorzystane do badania metabolizmu, wizualizacji dystrybucji leków i biomolekuł w miejscu ich działania, obserwacji złożonych interakcji wewnątrzkomórkowych, a nawet konstruowania terapeutycznych biokoniugatów [2]. Niestety, reakcje aktualnie wykorzystywane w chemii organicznej posiadają pewne ograniczenia i nie jest możliwe zastosowanie ich w chemii bioortogonalnej. Dodatkowo, stosunkowo ograniczona ilość reakcji bioortogonalnych w porównaniu do możliwości chemii organicznej sprawia, że poszukiwania nowych reakcji są atrakcyjnym celem badań.

Ten jakże elegancki koncept jakim jest chemia bioortogonalna, zainspirował wielu chemików biologicznych do przemyśleń jak sprawić by komórki Danio pręgowanego bądź nowotworowe przemienić w kolby reakcyjne. Jest to niezwykłe wyzwanie, które poddaje próbie wyobraźnię badaczy, a także ich zdolność do nieszablonowego myślenia, gdzie konieczne jest wykorzystanie kompleksowej wiedzy łączącej różne dziedziny nauki. Możliwości jakie prezentuje chemia bioortogonalna sprawiają, że pomysły takie jak synteza farmaceutyków wewnątrz organizmu przestają być jedynie zagadnieniem typu *science fiction* z książek i filmów.

1. CHEMIA BIOORTOGONALNA

Clou chemii bioortogonalnej jest wspomniana wcześniej możliwość prowadzenia reakcji w żywych komórkach bez uszczerbku dla nich. By jednak było

to możliwe konieczne jest spełnienie szeregu wymagań, dzięki którym reakcja będzie mogła zostać uznaną za bioortogonalną. Przede wszystkim reakcja kandydująca do tego miana musi spełniać kryteria reakcji *click* [3]. Są to:

- Selektywność – reakcja musi zachodzić z uniknięciem reakcji ubocznych z innymi związkami biologicznymi niż główny cel,
- Inertność chemiczna – połączenie kowalencyjne musi być odporne na reakcje biologiczne,
- Inertność biologiczna – zarówno substraty jak i produkty reakcji nie mogą być reaktywne i nie powinny zaburzać funkcjonowania badanego organizmu,
- Biokompatybilność – reakcja powinna być możliwie nietoksyczna i musi zachodzić w warunkach fizjologicznych: wodnym środowisku, pH zbliżonym do 7 i temperaturze odpowiadającej temperaturze organizmu (ok. 37°C). Wraz ze wzrastającą ilością badań *in vivo* w modelach zwierzęcych coraz większym problemem staje się odpowiednia farmakokinetyka,
- Odpowiednia kinetyka reakcji – reakcje używane są w obrazowaniu metabolizmu i klirensu, więc muszą zachodzić niezwykle szybko. Dodatkowo, konieczna jest również wysoka wydajność reakcji. Zapobiega to zachodzeniu wspomnianych reakcji ubocznych, które mogłyby również zmniejszyć sygnał pochodzący od rzadziej występujących cząsteczek. Szybsze reakcje dodatkowo oferują szybszą odpowiedź, która jest istotna w przypadku śledzenia dynamicznych procesów.

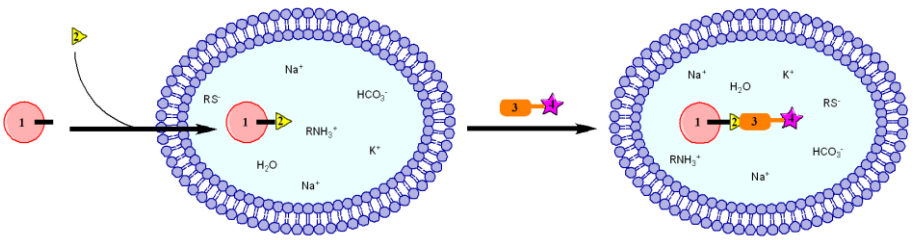
Szybkość reakcji jest niezwykle istotna w chemii bioortogonalnej z powodu stężeń, które są dużo niższe od tych wykorzystywanych w syntezie chemicznej.

Początkowym celem chemii bioortogonalnej było znakowanie i wizualizacja pojedynczych biomolekuł [4] jednakże, dzięki połączeniu z zaawansowanymi technikami omicznymi (takimi jak proteomika i jej odmiana – glikoproteomika) może być używana do badania i modyfikowania złożonych interakcji [5]. Badania reakcji bioortogonalnych skupiają się aktualnie przede wszystkim na jednoczesnym użyciu więcej niż jednej reakcji [3]. Zrozumienie złożoności systemów biologicznych i krzyżowej reaktywności między reakcjami bioortogonalnymi jest niezwykle istotne by projektować eksperymenty, w których wiele cząstek biologicznych zostanie oznakowanych lub poddanych manipulacji.

1.1. LIGACJA BIOORTOGONALNA

Istotą chemii bioortogonalnej jest ligacja bioortogonalna – selektywna reakcja dwóch reaktywnych grup, które jednocześnie nie reagują z innymi związkami

chemicznymi czy grupami funkcyjnymi obecnymi w próbce (Rysunek 1). Z tego też powodu ligacja może być prowadzona wewnątrz komórek, w ekstraktach komórkowych a nawet wewnątrz żywych organizmów z niewielką lub całkowicie bez niechcianej reaktywności krzyżowej.

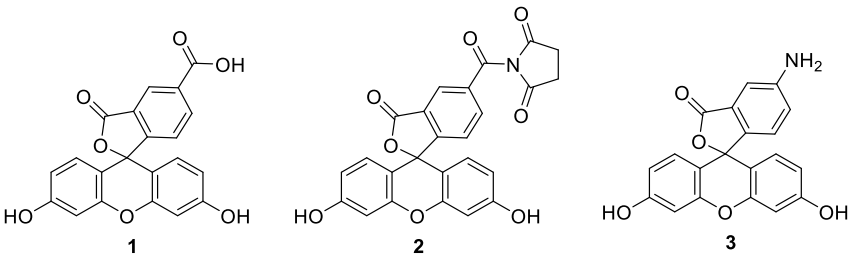


Rysunek 1. Proces ligacji bioortogonalnej
1 – cząsteczka biologiczna (cel badania); **2** – specyficzna grupa funkcyjna, obecna w jednym z substratów; **3** – partner reakcji bioorotogonalnej; **4** – znacznik; niebieski obszar reprezentuje komórkę

Figure 1. Bioorthogonal ligation process
1 – biomolecule (target); **2** – specific moiety, present in one of the substrates; **3** – bioorthogonal reaction partner; **4** – probe; blue area represents cell

Istnieje kilkadziesiąt reakcji dostępnych do celów biokoniugacji, które zostały zaprojektowane do pracy z biomolekułami i grupami funkcyjnymi obecnymi w ich strukturach. Celem technik biokoniugacji było użycie wspomnianych grup funkcyjnych do oznaczenia biocząsteczek syntetycznymi sondami (np. cząsteczkami fluoryzującymi, Rysunek 2) lub innymi biocząsteczkami [6]. Jednakowoż, różnorodność biocząsteczek w organizmach i komórkach jak również liczba reaktywnych centrów obecnych w ich strukturze sprawia, że kompletna bioortogonalność i chemoselektywność staje się trudna do uzyskania. Nawet najlepsze odczynniki do znakowania często wykazują reaktywność krzyżową z grupami funkcyjnymi występującymi w biocząsteczkach.

W rzeczywistości pary reagentów, które zostały stworzone odniosły w różnym stopniu sukces w wypełnieniu zadania pełnej bioortogonalności. W każdym z tych systemów para chemoselektywnych reagentów może być osobno przyłączona lub włączona do odczynnika znakującego i użyta do modyfikacji biocząsteczek, cząstek, powierzchni lub związków organicznych. Następnie znakowane związki mogą być łączone aby ułatwić sprzęganie bioortogonalnych partnerów w złożonych roztworach. Następne sekcje zawierają opis kilku przykładów zastosowań zdobyczy chemii bioortogonalnej.



Rysunek 2. Znaczniki fluorescencyjne;
1 – 5-karboksyfluoresceina, stosowana w reakcji z aminami; **2** – ester imidu kwasu bursztynowego **5**-karboksyfluoresceiny, wykorzystywany w reakcji z aminami; **3** – 5-aminofluoresceina, wykorzystywana przy sprzęganiu z aktywnymi pochodnymi kwasów karboksylowych

Figure 2. Structures of fluorescent probes;
1 – 5-carboxyfluorescein, used in reactions with amines; **2** – 5-carboxyfluorescein succinic imide ester, used in reactions with amines; **3** – 5-aminofluorescein, used for coupling with active derivatives of carboxylic acids

2. ZASTOSOWANIA CHEMII BIOORTOGONALNEJ

Jak wspomniano powyżej, chemia bioortogonalna znalazła szerokie zastosowanie – od inżynierii glikanów aż po obrazowanie *in vivo*. W zależności od wymagań jakie stawia konkretne zastosowanie, dostępnych jest jedna lub więcej reakcji bioortogonalnych. Wraz z coraz większą popularnością chemii bioortogonalnej odkrywane są kolejne możliwości jej wykorzystania. Możliwość łączenia ze sobą biologii i chemii stwarza niezwykłe możliwości ale również stawia wyzwania, z którymi badacze muszą się zmierzyć.

2.1. ZNAKOWANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

Kwasy nukleinowe (zarówno DNA jak i RNA) są podstawowymi nośnikami informacji genetycznej w organizmach i wirusach. Wraz z białkami, lipidami i polisacharydami stanowią podstawowe cząstki niezbędne dla istnienia życia. Prócz bycia nośnikami informacji w organizmach, niektóre rodzaje RNA posiadają także właściwości katalityczne [7]. Z tych powodów stanowią atrakcyjny cel badań.

Podstawową jednostką budulcową (monomerem) kwasów nukleinowych są nukleotydy. Zbudowane są one z pięciowęglowej jednostki cukrowej (deoksyrybozy w DNA i rybozy w RNA), zasady azotowej (adeniny, tyminy, cytozyny i guaniny w DNA oraz uracylu, który w RNA występuje w miejsce tyminy) i reszty kwasu fosforowego(V). Wraz z rozwojem technologii ludzie

nauczyli się modyfikować naturalnie występujące kwasy nukleinowe a nawet tworzyć własne analogi tychże (jak np. PNA – kwas peptydonukleinowy). Obecnie, modyfikowane chemicznie oligonukleotydy są często używane w biologii, nanotechnologii i diagnostyce. Chemia bioortogonalna jest jednym z narzędzi stosowanych do znakowania i modyfikowania kwasów nukleinowych.

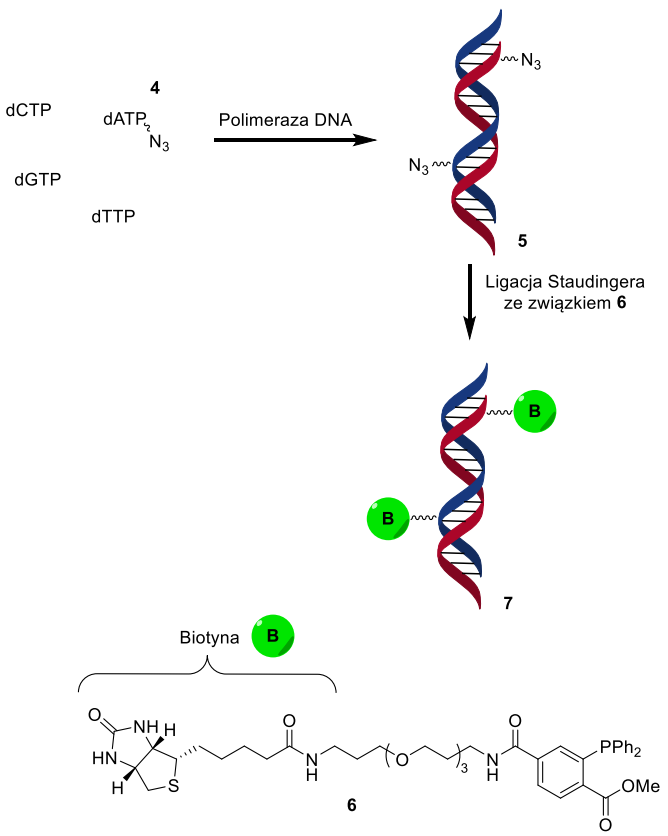
2.1.1. Biotynylowanie DNA

Biotyna, zwana także witaminą H lub B_7, jest witaminą mającą szerokie zastosowanie w procesach metabolicznych, głównie tych powiązanych z wykorzystaniem tłuszczy, węglowodanów i aminokwasów [8]. Znalazła ona również zastosowanie w biotechnologii, gdzie jej modyfikacja wykorzystywana jest do znakowania, wykrywania m.in. białek, oczyszczania i immobilizacji [9]. Dzieje się tak dzięki jej niezwykle silnemu powinowactwu do awidyny, streptawidyny i innych dostępnych komercyjnie modyfikacji tego białka. W rzeczy samej, jest to jedno z najsilniejszych wiązań niekowalencyjnych występujących między ligandem i białkiem. W zależności od wykorzystywanej techniki może to stanowić zaletę ale także wadę.

Biotynylacja jest procesem, w którym białko bądź nukleotyd jest łączony z cząsteczką biotyny. Proces ten może być przeprowadzony zarówno metodami chemicznymi jak i enzymatycznymi. W pierwszym przypadku korzysta się ze specjalnie przygotowanego reagenta składającego się z grupy biotynylowej, łącznika (tzw. „spacer arm") oraz reaktywnej grupy odpowiadającej za przyłączenie do docelowej biomolekuły. Jedną z takich grup może być pochodna fosfiny **6** (Rysunek 3).

By mogła zajść reakcja bioortogonalna konieczna jest obecność specyficznego partnera bioortogonalnego. Taką rolę spełnia zmodyfikowana cząsteczka DNA **5**. Do jej syntezy przygotowano zmodyfikowane trójfosforany nukleozydów – dNTP (cząsteczek zbudowanych z pięciowęglowego cukru i zasady azotowej) z przyłączoną grupą azydkową [10–12]. Mając gotowe analogi dNTP można je włączyć w przygotowywany łańcuch DNA, dzięki syntezie DNA sterowanej przez polimerazę DNA. Możliwe jest również powielanie otrzymanych nici DNA dzięki wykorzystaniu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) [13]. Mając dostępne oba substraty możliwe jest przeprowadzenie bioortogonalnej ligacji Staudingera (Rysunek 3). W rezultacie koniugacji otrzymujemy znakowane biotyną DNA. Etap ligacji zachodzi w środowisku komórki dzięki czemu możliwe jest np. badanie losów DNA w komórce (np. przy pomocy testu EIA). Ta metoda biotynylacji może być oczywiście wykorzystywana do znakowania innych biomolekuł dzięki czemu wykorzystanie testów korzystających z biotyny staje się jeszcze prostsze.

Naturalnie, ligacja Staudingera znajduje zastosowanie nie tylko w biotynylacji DNA i RNA [10] ale również w znakowaniu radionuklidami [14,15], syntezie peptydów/białek, modyfikowaniu potranslacyjnym [16], a także w tzw. mikromacierzach pokrywających (z ang. *coating microarrays*) [17–19]. W ostatnich latach grupa Bertozzi pionierskо wykorzystała ligację Staudingera do profilowania glikoprotein.



Rysunek 3. Znakowanie DNA biotyną dzięki ligacji Staudingera
Figure 3. Labelling DNA with biotin via the Staudinger Ligation

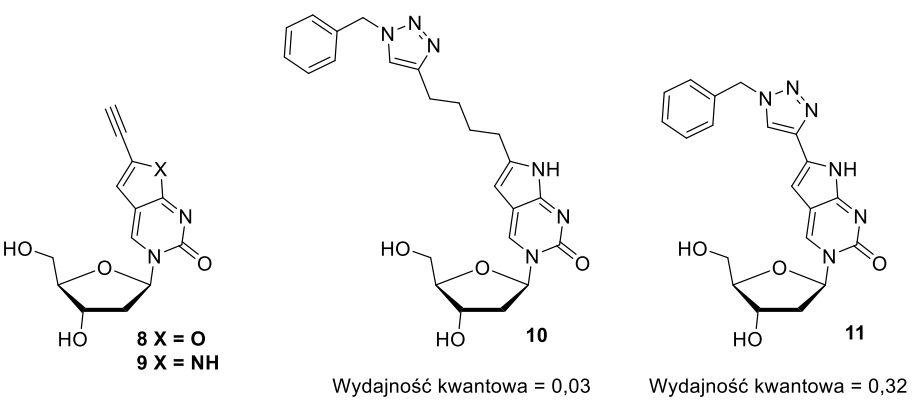
2.1.2. Fluoryzujące analogi nukleozydów

Fluorescencja jest użytecznym narzędziem wykorzystywanym do badania struktury, interakcji i dynamiki kwasów nukleinowych [20]. Kanoniczne zasady azotowe wchodzące w skład kwasów nukleinowych praktycznie nie wykazują fluorescencji. Powstało natomiast wiele fluoryzujących analogów nukleozydów,

w tym uczestniczące w przenoszeniu ładunku [21], które następnie zostały włączone w strukturę DNA [22]. Analogi te nie tylko posiadają właściwości emisyjne ale również nie zaburzają struktury DNA [23]. Wartościowym dodatkiem do zbioru fluoryzujących analogów nukleozydów pirymidynowych są pirolo-dC (pirolo-deoksycytydyny) [24].

Przygotowano serię pirolo-dC z przyłączonym szkieletem 1,2,3-triazolowym, który następnie zostały włączone w oligonukleotydy. Ugrupowanie triazolowe było przyłączane na dwa sposoby – bezpośrednio do pierścienia pirolowego lub przy pomocy łącznika *n*-butylowego. Wykazano, że nukleozydy, które mają bezpośrednio przyłączoną grupę triazolową charakteryzują się dużo wyższą wydajność kwantową fluorescencji (F = 0,32) niż te gdzie obecny jest też łącznik (F ~ 0,03) (Rysunek 4).

Modyfikowane w ten sposób pirolo-dC były wykorzystane jako fluoryzujący sensor w rozróżnianiu nukleozasad w podwójnej helisie DNA. Tak skonstruowane fluoryzujące nukleozydy mają szansę znaleźć zastosowanie w detekcji SNP (ang. *single nucleotide polymorphisms*) w długich łańcuchach DNA, w przypadkach gdy zawodzą klasyczne techniki, takie jak analiza topnienia wysokiej rozdzielczości [23].



Rysunek 4. Fluoryzujące analogi nukleozasad
Figure 4. Fluorescent nucleobase analogs

2.2. ZNAKOWANIE BIAŁEK

Białka to druga po kwasach nukleinowych grupa cząsteczek niezbędnych do funkcjonowania organizmu. Są to wielkocząsteczkowe biokondensaty zbudowane z aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniem peptydowym. Występują one we wszystkich organizmach żywych a także wirusach.

Biosynteza białek to niezwykle istotny i fascynujący proces. Zachodzi on w kilku etapach, którego pierwszy – transkrypcja, jest przeprowadzany w jądrze komórkowym. Kolejny – translacja, przeprowadzany jest w cytoplazmie przy udziale rybosomów. By białko mogło pełnić swoją funkcję konieczne jest dokonanie szeregu modyfikacji potranslacyjnych, np. przyłączenie grupy fosforanowej (fosforylacja), reszty cukrowej (glikozylacja) lub lipidowej (lipidacja) [7].

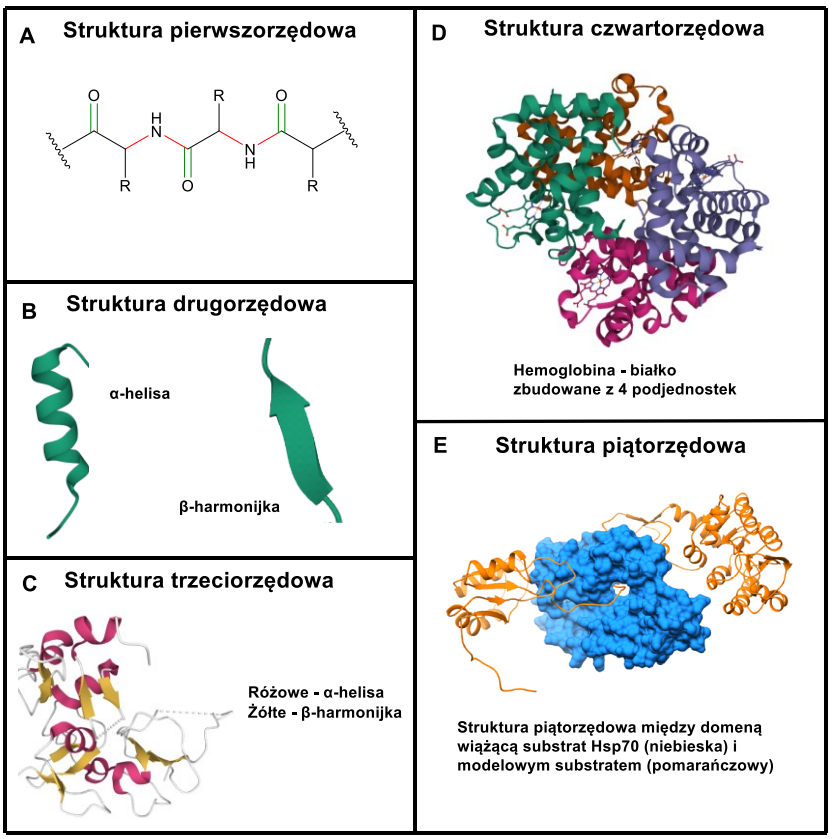
Istotną cechą białek jest również ich struktura przestrzenna. Organizację przestrzenną białek można opisać na czterech poziomach:

- Struktura pierwszorzędowa – kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym,
- Struktura drugorzędowa – wzajemne przestrzenne ułożenie reszt aminokwasowych, które ze sobą sąsiadują w sekwencji liniowej (np. przyjęcie regularnej struktury helisy α, harmonijki β),
- Struktura trzeciorzędowa – przestrzenne ułożenie reszt aminokwasowych oddalonych od siebie w sekwencji liniowej
- Struktura czwartorzędowa – ułożenie przestrzenne podjednostek białkowych i grup prostetycznych, posiadają ją jedynie białka, które składają się z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego (podjednostki) [7].

Niektórzy wyróżniają także piąty poziom organizacji – strukturę piątorzędową. Terminem tym określa się krótko żyjące funkcjonalne kompleksy białek z biomolekułami (innymi białkami, DNA, RNA, węglowodanami, lipidami) [25,26]. W odróżnieniu od oddziaływań czwartorzędowych, oddziaływania piątorzędowe są słabe i przejściowe. Dodatkowo występują jedynie w zatłoczonym wnętrzu komórki [27]. Mimo swojej przejściowości jest ona niezwykle istotna by zachować prawidłowe funkcjonowanie komórki. O tym jak ważne jest zachowanie odpowiedniej struktury białka na każdym z poziomów skomplikowania świadczy występowanie chorób prionowych oraz schorzeń zależnych od prionoidów, gdzie złe sfałdowanie białka PrP^{C} prowadzi do przekształcenia go w białko PrP^{Sc} tworzące śmiertelnie groźne agregaty [28,29]. Również inne białka mogą tworzyć agregaty powodujące zaburzenia zdrowia. Jednym z takich białek jest białko p53, zwane strażnikiem genomu, w którym mutacja może wywołać destabilizację struktury trzeciorzędowej co skutkuje agregowaniem białka jako amyloidu i utratą aktywności [29].

Istnieje wiele metod badania białek, ich struktury, interakcji i metabolizmu, w których do struktury białka włączany jest chemicznie lub biologicznie zainspirowany znacznik. W swej naturze opierają się one głównie na podejściu metabolicznym lub genetycznym. Chemia bioortogonalna stanowi bardzo dobrą

metodę, umożliwiającą znakowanie białek w ich naturalnym środowisku – w komórce [30]. Dodatkową zaletą kontrolowanego znakowania białek jest możliwość wykorzystania go w biosensingu, wielofunkcyjnych lekach, inteligentnych materiałach i ulepszonych lekach opartych na białkach [31].



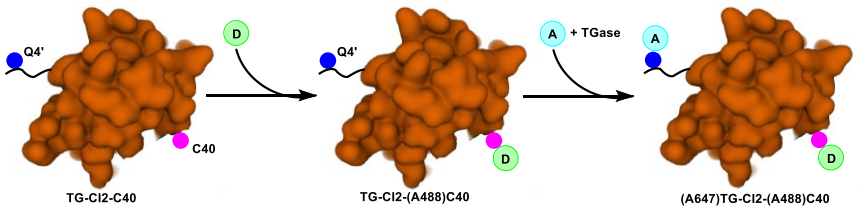
Rysunek 5. Poziomy organizacji przestrzennej białek. (A) Struktura pierwszorzędowa złożona z aminokwasów połączonych wiązaniami amidowymi. (B) α-helisa i β-harmonijka będące przykładami sfałdowania struktury drugorzędowej (C) Struktura trzeciorzędowa domeny PZP białka AF10 (PDB ID: 7MJU) złożona z α-helis i β-harmonijek. (D) Hemoglobina (PDB ID: 1HV4) – przykład struktury czwartorzędowej białka złożonego z dwóch par podjednostek. (E) Słabe oddziaływania piątorzędowe między domeną wiążącą substrat białka Hsp70 (niebieska, PDB ID: 2KHO) i modelowym substratem kinazy fosfoglicerynianowej (pomarańczowy, PDB ID: 3PGK)

Figure 5. Levels of the protein structure. (A) Primary structure composed of amino acids linked by amide bonds. (B) α-helix and β-sheet, which are examples of folding of the secondary structure. (C) Tertiary structure of the PZP domain of the AF10 protein (PDB ID: 7MJU) composed of α-helices and β-sheets. (D) Hemoglobin (PDB ID: 1HV4) - An example of the quaternary structure of a protein composed of two pairs of subunits. (E) Weak quinary interactions between the Hsp70 protein substrate binding domain (blue, PDB ID: 2KHO) and the model substrate phosphoglycerate kinase (orange, PDB ID: 3PGK)

2.2.1. Badanie wewnątrzcząsteczkowych zmian konformacyjnych

Jak wspomniano wcześniej struktura przestrzenna ma kluczowe znaczenie dla aktywności białek. Choroby neurodegeneracyjne takie jak choroba Alzheimera czy Parkinsona, choroba Huntingtona, choroba Gauchera a także np. mukowiscydoza mają swoje przyczyny w nieprawidłowym sfałdowaniu i/lub zmianach konformacyjnych białek, które następnie agregują prowadząc do wymienionych schorzeń [32,33]. W badaniu zmian następujących w konformacji białek szczególne uznanie mają metody wykorzystujące mechanizm transferu takie jak fotoindukowany transfer elektronów (PET), a także różne odmiany försterowskiego (fluorescencyjnego) transferu energii rezonansowej (FRET) w tym szczególnie försterowski transfer energii rezonansowej pojedynczych cząstek (smFRET). Głównym ograniczeniem stosowania tych metod, zwłaszcza FRET, jest konieczność podwójnego znakowania badanych białek komplementarnymi materiałami donorowymi i akceptorowymi. Oznaczanie specyficzne dla danego miejsca okazało się być użyteczną odpowiedzią na stawiane potrzeby.

Wśród metodologii stosowanych w podwójnym znakowaniu białek wiele korzysta z reszt cysteiny włączonych w strukturę białek. Seo i współpracownicy wykorzystali unikalne cysteiny wraz z włączaniem niewystępujących naturalnie aminokwasów [34]. Wykorzystano to w badaniach nad białkiem wiążącym maltozę (MBP), rozwijanie struktury którego badano w warunkach denaturujących z wykorzystaniem smFRET. W przypadku badań prowadzonych nad fałdowaniem inhibitora chymotrypsyny 2 (CI-2) z kolei, Jäger i współpracownicy wykorzystali dwuetapowe podejście chemiczno-enzymatyczne by wyznakować podwójnie modelowe białko (Rysunek 6) [35]. Przygotowano wariant CI-2, który zawierał wyeksponowaną resztę cysteiny, którą można było oznaczyć fluoryzującym malemidem Alexa 488. Do N-końca CI-2 została dołączona peptydowa sekwencja znacznikowa specyficzna dla transglutaminazy tkankowej (TGase). Ułatwiła ona wyznakowanie kadaweryną Alexa 647 w obecności wspomnianej transglutaminazy. Reakcja opiera się na przeniesieniu grupy acylowej między pierwszorzędową aminą obecną w Alexa 647 i reaktywną resztą glutaminy obecną w znaczniku na N-końcu. W wyniku badań smFRET zwijania białka wykazano, że te stosunkowo niewielkie znaczniki nie wpływają na termodynamikę zwijania w warunkach denaturujących [30].



Rysunek 6. Schemat znakowania inhibitora chymotrypsyny 2 (PDB ID: 1Y1K). Wyeksponowana reszta cysteiny Cys40 została oznaczona różowym punktem (C40). N-końcową peptydową sekwencję znacznikową specyficzną dla transglutaminazy tkankowej oznaczono poprzez czarną linię. Niebieski punkt (Q4') reprezentuje reaktywną resztę glutaminy. Pozostałe dwie sfery oznaczają odpowiednio malemid A488 (zielona sfera oznaczona D) i kadawerynę A647 (jasnoniebieska sfera oznaczona A)

Figure 6. Labelling scheme for Chymotrypsin 2 inhibitor (PDB ID: 1Y1K). The exposed residue of cysteine Cys40 was depicted by a pink dot (C40). The tissue transglutaminase specific N-terminal peptide tag sequence is shown as the black line. The blue dot (Q4') represents the reactive glutamine residue. The two spheres depicts malemide A488 (green sphere labelled D) and cadaverine A647 (light blue sphere labelled A), respectively

2.2.2. Śledzenie interakcji między białkami

Oddziaływania międzycząsteczkowe między białkami mogą być badane poprzez obserwację zmian konformacyjnych zachodzących w znakowanym białku. Inną, popularniejszą, metodą jest znakowanie obu białek, które ze sobą oddziałują. Najpowszechniej wykorzystywany w tym celu jest FRET i barwniki biarsenowe.

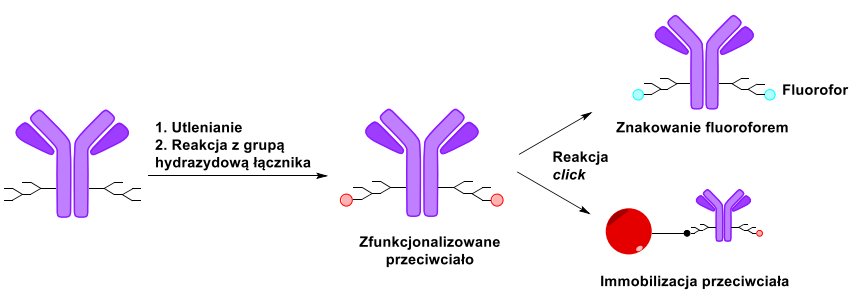
Barwniki biarsenowe takie jak FlAsH i ReAsH są wykorzystywane w badaniu interakcji między białkami na dwa sposoby. W pierwszym podejściu jedna cząsteczka jest znakowana znacznikiem tetra-Cys. Monitorowana jest następnie zdolność barwnika do związania się z proteiną w stanie wolnym oraz w czasie interakcji [36–38]. Drugie podejście opiera się na wykorzystaniu międzycząsteczkowego, obustronnego tetra-Cys. Technologia ta została stworzona przez Schepartza i współpracowników. Wykorzystuje się w niej obecność w strukturze obu partnerów pary Cys-Cys, która w wyniku interakcji obu białek zaczyna się do siebie zbliżać. Sprawia to, że biarsenowy barwnik może się związać [39,40]. Pierwsze podejście wykorzystywane jest w badaniu agregacji białek w takich schorzeniach jak choroba Alzheimera, Huntingtona czy chorobach prionowych. Możliwe dzięki temu staje się poznanie mechanizmu i patologii tych chorób [36–38]. Metoda stworzona przez Schepartza i współpracowników znalazła zastosowanie w badaniu dimeryzacji zasadowych regionów zamka leucynowego białka GCN4 i Jun [39,40]. Punktowa mutacja zaburzająca dimeryzację w wariantach białek GCN4 i Jun, sprawia że wykazują one znacznie mniejsze powinowactwo do FlAsH i ReAsH, a w wyniku tego mniejszą fluorescencję. Dzięki

temu przykładowi można dostrzec specyficzność tego podejścia przy tworzeniu dimerów [39].

2.2.3. Biosensing

Technologie biosensingu zwykle wykorzystują szerokie spektrum komponentów, które mogłyby skorzystać ze znakowania specyficznego dla danego miejsca. Ułatwiona immobilizacja białek na powierzchniach znalazła zastosowanie w mikromacierzach i testach biologicznych [41]. Również biokoniugacja białek z nanomateriałami może być wykorzystana w różnorodnych testach i metodach obrazowania [42,43].

Wiele technologii biosensingu opartych na białkach korzysta z przeciwciał, które wykorzystywane są do rozpoznawania celu, a także znakowane fluorescencyjnie dzięki czemu możliwa jest detekcja. Le i współpracownicy zsyntetyzowali heterobifunkcjonalne łączniki oparte na hydrazydach, które mogą sprzęgać azydek Alexa Fluor 488 z ludzkim przeciwciałem IgG (hIgG) (Rysunek 7) [44]. Grupy węglowodanowe przeciwciała zostały utlenione do aldehydów co miało na celu ułatwienie reakcji z grupą hydrazydową heterobifunkcjonalnego łącznika. Sfunkcjonalizowane w ten sposób hIgG zostało sprzężone z azydkiem Alexa fluor 488 w obecności miedzi dzięki cykloaddycji *click*. Charakteryzacja fluorescencyjna reakcji koniugacji wykazała specyficzność do ciężkich łańcuchów regionu Fc przeciwciała.



Rysunek 7. Schematyczne przedstawienie funkcjonalizacji przeciwciała
Figure 7. Schematic representation of antibody functionalization

2.3. ZNAKOWANIE GLIKANU

Glikozylacja to proces modyfikacji potranslacyjnych, który jest związany z modyfikacją funkcji białek. Zmiany w prezentowanych na powierzchni komórek cukrach występują w wielu schorzeniach, np. w przypadku nowotworów [30]. Dodatkowo, wiele bakterii i wirusów potrafi ułatwić rozpoczęcie infekcji poprzez

wykorzystanie glikozylacji gospodarza. Niestety, badanie glikozylowanych cząsteczek w środowisku komórki nie jest prostym zadaniem. Trudności w wykorzystaniu do tego celu klasycznych metod (np. znakowanie białkiem zielonej fluorescencji) sprawiają, że konieczne staje stworzenie narzędzi mogących wyznakować specyficzne struktury.

Dzięki zastosowaniu technik chemii bioortogonalnej możliwe jest znakowanie naturalnie występujących glikanów. Dodatkową zaletą jest fakt, że wykorzystanie tych metod umożliwia znakowanie na całej komórce lub lizacie. Zakres tych techniki rozciąga się od oksydacji glikanów by wprowadzić grupy aldehydowe (znakowanie chemoselektywne) do używania modyfikowanych genetycznie glikotransferaz, które dodają niewystępujące naturalnie glikany na specyficzne cukry (znakowanie chemoenzymatyczne) [30].

Chemoselektywne techniki znakujące zawierają w sobie utlenianie nadjodanem i katalizowaną aniliną ligację oksymów (PAL) [45], a także utlenianie galaktozy przy wykorzystaniu oksydazy galaktozy a następnie katalizowaną aniliną ligację oksymów (GAL) [46]. W obu przypadkach pierwszym etapem jest utlenianie mające na celu wprowadzenie grupy aldehydowej do terminalnego kwasu sialowego (w PAL) lub do reszt galaktozy/N-acetylogalaktozoaminy (GAL). Reaktywne grupy aldehydowe są unikalne dla zewnątrzkomórkowego środowiska, co sprawia, że znakomicie nadają się jak uchwyt do specyficznego znakowania glikanów. Techniki te dają nadzieję na łatwiejsze badania glikoproteomiczne i proteomiczne zmian w glikozylacji w czasie stanów chorobowych lub zaburzeń w glikozylacji komórkowej.

UWAGI KOŃCOWE

W publikacji tej zaprezentowano wybrane reakcje bioortogonalne i zastosowania jakie znalazły w badaniach in vitro i in vivo. Wykorzystuje się je w znakowaniu biomolekuł, m.in. białek, DNA czy cukrów. Wyznakowane znacznikami fluorescencyjnymi DNA stanowi użyteczne narzędzie używane w badaniach struktury, interakcji i dynamiki kwasów nukleinowych. W przypadku białek, chemia bioortogonalna znakomicie sprawdza się w badaniach zmian konformacyjnych oraz interaktomu. Łącząc wymienione w artykule techniki z dziedzinami takimi jak genomika, proteomika i glikoproteomika możliwe jest jeszcze dokładniejsze badanie procesów przebiegających wewnątrz komórek. Jest to niezwykle przydatna wiedza, która może zostać wykorzystana w opracowywaniu nowych generacji leków.

Jednym z celów, do których dąży chemia bioortogonalna jest łączenie fragmentów leku w całość w miejscu jego działania (in situ). Pozwolić to może na zmniejszenie toksyczności leków oraz zwiększenie komfortu pacjenta. Możliwości jakie daje chemia

bioortogonalna są obecnie niezwykle duże, a wraz z dalszym rozwojem dziedziny zapewne będą się jeszcze bardziej zwiększać.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, Angew. Chemie - Int. Ed., 2009, **48**, 6974.
[2] B. Oller-Salvia, G. Kym, J.W. Chin, Angew. Chem. Int. Ed., 2018, **57**, 2831.
[3] M.L. W.J. Smeenk, J. Agramunt, K.M. Bonger, Curr. Opin. Chem. Biol. 2021, **60**, 79.
[4] E. Saxon, C.R. Bertozzi, Science, 2000, **287**, 2007.
[5] D.R. Spiciarich, R. Nolley, S.L. Maund, S. C. Purcell, J. Herschel, A.T. Iavarone, D.M. Peehl, C.R. Bertozzi, Angew. Chem. Int. Ed., 2017, **56**, 8992.
[6] G. Hermanson, *Bioconjugate Techniques: Third Edition*, Academic Press, London, 2013.
[7] L. Stryer, J.M. Berg, J.L. Tymoczko, G. Gatto, *Biochemistry, Ninth Edition. Macmillan,* New York, 2019.
[8] W.T. Penberthy, M. Sadri, J. Zempleni, *Chapter 17 - Biotin*, in edited by B.P. Marriott, D.F. Birt, V.A. Stallings, A.A.B.T.-P.K. in N. (Eleventh E. Yates (Academic Press, 2020), pp. 289–303.
[9] Thermo Fisher, *Chemical Reactivity of Crosslinkers and Modification Reagents*, Crosslink. Technol. React. Chem. Appl. Struct. Ref. 3, 2012.
[10] M.-L. Winz, E.C. Linder, T. André, J. Becker, A. Jäschke, Nucleic Acids Res., 2015, **43**, e110.
[11] C. Wu, T. Kurinomaru, Anal. Sci. Int. J. Japan Soc. Anal. Chem., 2019, **35**, 301.
[12] S.H. Weisbrod, A. Marx, Chem. Commun. (Camb)., 2007, 1828.
[13] S.H. Weisbrod, A. Baccaro, A. Marx, Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)., 2008, 383.
[14] J.C. Knight, B. Cornelissen, Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 2014, **4**, 96.
[15] M. Pretze, F. Wuest, T. Peppel, M. Köckerling, C. Mamat, Tetrahedron Lett., 2010, **51**, 6410.
[16] C. Bednarek, I. Wehl, N. Jung, U. Schepers, S. Bräse, Chem. Rev. **120**, 2020, 4301.
[17] C.I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers, S. Bräse, Chem. Soc. Rev., 2011, **40**, 4840.
[18] M. Köhn, R. Breinbauer, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, **43**, 3106.
[19] S.S. van Berkel, M.B. van Eldijk, J.C.M. van Hest, Angew. Chem. Int. Ed., 2011, **50**, 8806.
[20] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 1 Springer, Boston, 2006.
[21] R.W. Sinkeldam, N.J. Greco, Y. Tor, Chem. Rev., 2010, **110**, 2579.
[22] L.M. Wilhelmsson, Q. Rev. Biophys., 2010, **43**, 159.
[23] X. Ming, F. Seela, Chemistry, 2012, **18**, 9590.
[24] H. Inoue, A. Imura, E. Ohtsuka, Nippon KAGAKU KAISHI, 1987, **1987**, 1214.
[25] D. Guin, M. Gruebele, Chem. Rev., 2019, **119**, 10691.
[26] S. Ribeiro, S. Ebbinghaus, J.C. Marcos, FEBS Lett., 2018, **592**, 3040.
[27] R.D. Cohen, G.J. Pielak, J. Am. Chem. Soc., 2016, **138**, 13139.
[28] J. Bieschke, P. Weber, N. Sarafoff, M. Beekes, A. Giese, H. Kretzschmar, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2004, **101**, 12207.
[29] C. Scheckel, A. Aguzzi, Nat. Rev. Genet., 2018, **19**, 405.
[30] W.R. Algar, P.E. Dawson, I.L. Medintz, *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions,* Wiley-VCH, Weinheim, 2017.
[31] N. Stephanopoulos, M.B. Francis, Nat. Chem. Biol., 2011, **7**, 876.
[32] J.-H. Zhao, H.-L. Liu, H.-Y. Lin, C.-H. Huang, H.-W. Fang, S.-S. Chen, Y. Ho, W.-B. Tsai, W.-Y. Chen, Perspect. Medicin. Chem., 2008, **1**, 39.
[33] R. Santucci, F. Sinibaldi, L. Fiorucci, Mini Rev. Med. Chem., 2008, **8**, 57.
[34] M.-H. Seo, T.-S. Lee, E. Kim, Y.L. Cho, H.-S. Park, T.-Y. Yoon, H.-S. Kim, Anal. Chem., 2011, **83**, 8849.
[35] M. Jäger, E. Nir, S. Weiss, Protein Sci., 2006, **15**, 640.

[36] J. Gaspersic, I. Hafner-Bratkovic, M. Stephan, P. Veranic, M. Bencina, I. Vorberg, R. Jerala, FEBS J., 2010, **277**, 2038.
[37] Y. Hu, B. Su, C.-S. Kim, M. Hernandez, A. Rostagno, J. Ghiso, J.R. Kim, Chembiochem, 2010, **11**, 2409.
[38] Y.M. Ramdzan, R.M. Nisbet, J. Miller, S. Finkbeiner, A. F. Hill, D.M. Hatters, Chem. Biol., 2010, **17**, 371.
[39] N. Luedtke, R. Dexter, D. Fried, A. Schepartz, Nat. Chem. Biol., 2008, **3**, 779.
[40] R. Scheck , A. Schepartz, Acc. Chem. Res., 2011, **44**, 654.
[41] Y.-X. Chen, G. Triola, H. Waldmann, Acc. Chem. Res., 2011, **44**, 762.
[42] K.E. Sapsford, W.R. Algar, L. Berti, K.B. Gemmill, B.J. Casey, E. Oh, M.H. Stewart, I.L. Medintz, Chem. Rev., 2013, **113**, 1904.
[43] W.R. Algar, D.E. Prasuhn, M.H. Stewart, T.L. Jennings, J.B. Blanco-Canosa, P.E. Dawson, I.L. Medintz, Bioconjug. Chem., 2011, **22**, 825.
[44] H.T. Le, J.-G. Jang, J.Y. Park, C.W. Lim, T.W. Kim, Anal. Biochem., 2013, **435**, 68.
[45] Y. Zeng, T.N.C. Ramya, A. Dirksen, P.E. Dawson, J.C. Paulson, Nat. Methods, 2009, **6**, 207.
[46] T.N.C. Ramya, E. Weerapana, B.F. Cravatt, J.C. Paulson, Glycobiology, 2013, **23**, 211.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 października 2021 r.