

# Bioortogonalna kemija

---

**Podrug, Lucija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:849904>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-15**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Lucija Podrug

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **BIOORTOGONALNA KEMIJA**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

21. kolovoza 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:



## Sadržaj

§	SAŽETAK.....	VI
§ 1.	UVOD.....	1
§ 2.	REAKCIJE NA RAZLIČITIM FUNKCIONALNIM SKUPINAMA.....	3
2.1.	Ligacijske reakcije kroz aldehide i ketone.....	3
2.2.	Bioortogonalne reakcije temeljene na azidima.....	4
2.2.1.	<i>Staudingerova ligacija</i> .....	5
2.2.2.	<i>Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (I)</i> .....	9
§ 3.	METODE PROTEINSKE MODIFIKACIJE.....	12
3.1.	Modifikacije lizina i cisteina.....	12
3.1.1.	<i>Modifikacija lizina</i> .....	12
3.1.2.	<i>Modifikacija cisteina</i> .....	13
3.2.	Modifikacije metionina.....	14
3.3.	Modifikacije triptofana i tirozina.....	16
3.4.	Modifikacije na N-kraju.....	17
3.4.1.	<i>Modifikacija N-kraja ovisna o pH</i> .....	18
3.4.2.	<i>Modifikacija N-kraja ovisna o aminokiselini</i> .....	19
3.4.3.	<i>N-terminalna modifikacija kroz transaminaciju</i> .....	22
§ 4.	ZAKLJUČAK.....	23
§ 5.	LITERATURNI IZVORI.....	24



## § Sažetak

Složenost staničnih sustava veliki je izazov za proučavanje raznih biomolekula u njihovom prirodnom okruženju. Velika pažnja posvećena je selektivnosti obilježavanja kako bi se dobio uvid u same stanične procese. Ključan je razvoj tehnika i metoda koje će omogućiti brze i selektivne reakcije molekula između mnoštva funkcionalnih skupina koje se nalaze u samoj stanici. U novije vrijeme koristi se pojam „bioortogonalna kemija“ za sve kemijske reakcije koje se mogu pojaviti u živim sustavima bez da pritom ometaju prirodne biokemijske procese. Tako je omogućena modifikacija biomolekula i uvid u same stanične procese.

Molekule od interesa su upravo one koje se mogu uvesti u živi sustav, a da su u njima potpuno odsutne. To se postiže uvođenjem molekula poput azida, fosfina i alkina koje su ključne molekule za Staudingerovu ligaciju te za azid-alkin cikloadiciju kataliziranu bakrom (I). Te su reakcije od koristi ne samo za označavanje proteina već i za modifikaciju glikana, lipida, DNA i nukleinskih kiselina.

Kod samih proteina više je mogućnosti specifičnog obilježavanja jer oni sadržavaju aminokiseline koje imaju različite funkcionalne skupine, a samim time i brojne mogućnosti reagiranja.

Prvobitno su glavni ciljevi modificiranja proteina bili nukleofilni ostatci lizina i cisteina, a sada se razvijaju suvremene metode označavanja većeg broja aminokiselina, a prvenstveno onih na N-kraju proteina.



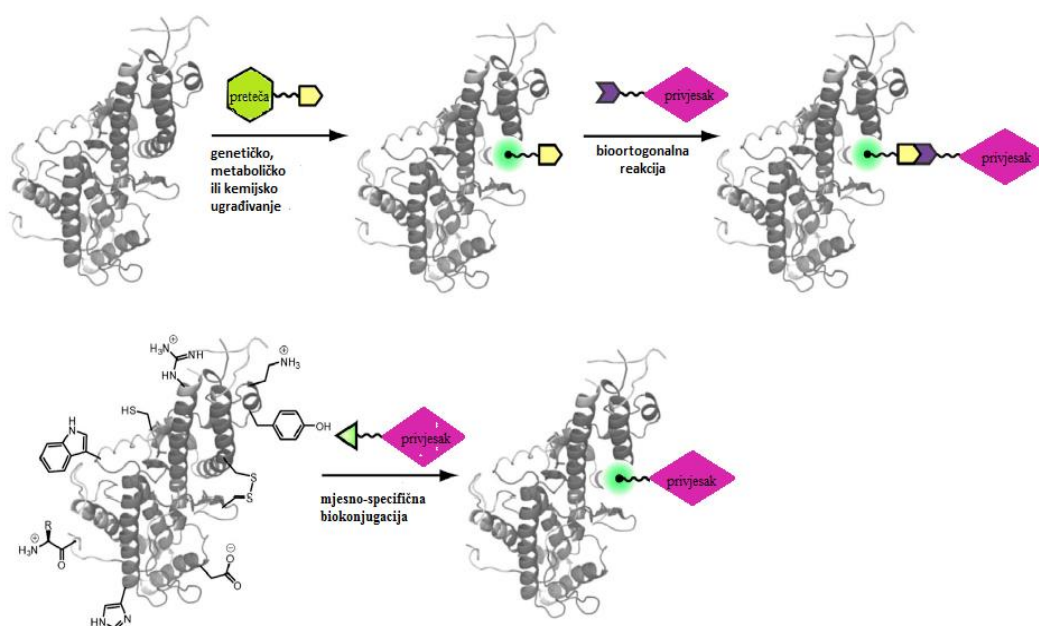


## § 1. UVOD

Označavanje bioloških molekula unutar stanice je svojevrstan problem zbog prisutnosti brojnih funkcionalnih skupina na glikanima, lipidima i drugim molekulama prisutnim u okolini. Zato je potrebno razviti visoko specifične reakcije u kojima će određeni reagensi reagirati samo s ciljanim skupinama.<sup>1</sup> Bioortogonalne reakcije su kemijske reakcije koje ne ometaju biološki sustav, a funkcionalne skupine koje u njima sudjeluju moraju biti inertne, netoksične za stanice i organizme te moraju djelovati u biološkim uvjetima uzimajući u obzir pH, vodeni medij i temperaturu. Također, poželjno je da je reaktivna skupina mala kako bi što manje ometala molekulu na koju je uvedena, a sama reakcija specifična i brza.<sup>2</sup>

Bioortogonalne reakcije obično ne ostavljaju nusprodukte, te eventualno oslobađaju dušik ili vodu.<sup>3</sup> Proces podrazumijeva dva koraka (slika 1). U prvom koraku se jedinstvena funkcionalna skupina – kemijski izvjestitelj (eng. *reporter*) – uvodi na određenu molekulu supstrata kemijskim, genetičkim ili metaboličkim putem. Molekula supstrata može biti aminokiselina u svrhu označavanja proteina, masna kiselina za označavanje lipida, monosaharid za označavanje glikana ili nukleozid za označavanje DNA. Kemijski izvjestitelj ne smije dramatično promijeniti strukturu supstrata kako ne bi došlo do promjene njegove bioaktivnosti. Jednom kada je kemijski izvjestitelj ugrađen u ciljnu biomolekulu, tretira se u drugom koraku s molekulom za ispitivanje – sondom – čime dolazi do vrlo specifične bioortogonalne reakcije.<sup>3,4</sup>

Sonde su u većini slučajeva fluorescentne te im se fluorescencija pojačava nakon bioortogonalne reakcije. Na taj se način olakšava vizualizacija i proučavanje biomolekula koje nisu genetski kodirane.<sup>5</sup>



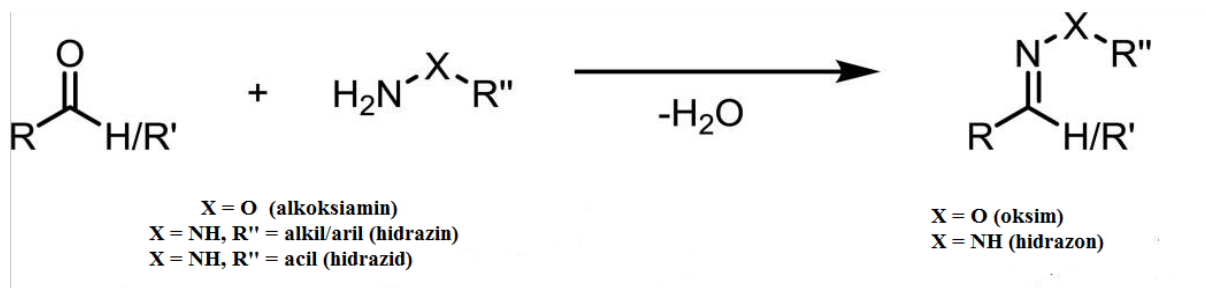
Slika 1. Metode uvođenja različitih funkcionalnih skupina na biomolekule (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 3).

## § 2. REAKCIJE NA RAZLIČITIM FUNKCIONALNIM SKUPINAMA

### 2.1. Ligacijske reakcije kroz aldehide i ketone

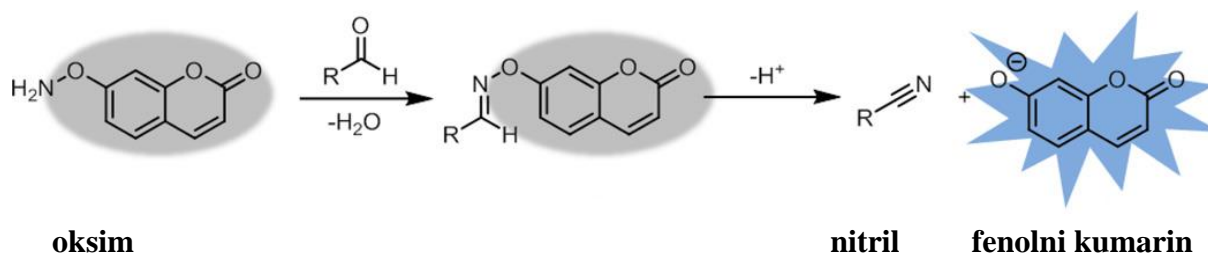
Kondenzacija aldehida s amskim nukleofilima, poput alkoksiamina ili hidrazina, kako bi se formirali oksimi ili hidrazonski spojevi, bila je jedna od prvih uobičajenih kemoselektivnih reakcija vezanja u biološkim sustavima (slika 2). Očito ograničenje na bioortogonalnost ove reakcije je prisutnost aldehida i ketona u metabolitima koji se pojavljuju unutar stanice. Međutim, aldehidi i ketoni nisu prisutni na staničnim površinama te mogu poslužiti kao jedinstveni kemijski izvjestitelji, čime je ovaj pristup djelotvorno bioortogonalan za reakcije na površini stanice.<sup>4,5</sup> Svakako, ulogu u odabiru baš tih skupina imala je njihova sintetička dostupnost kao i mala veličina.

Aldehidi i ketoni se uvode na stanične površine tako da se oksidiraju alkoholi i tioli koji se na njoj nalaze.<sup>5</sup>



Slika 2. Kondenzacija aldehida s alkoksiaminima, hidrazinima ili hidrazidima i formiranje oksima ili hidrazona (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 5).

Nakon formiranja oksima, eliminacija daje nitril i visoko fluorescentni fenolni kumarin koji omogućava vizualizaciju<sup>5</sup> kao što je prikazano na slici 3.



Slika 3. Vizualizacija nastalog oksima fragmentacijom na nitril i fluorescentni kumarin (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 5).

Kako su za prethodne reakcije nužni kiseli uvjeti koji su nepovoljni za stanicu, za reakcije se koristi anilin kao nukleofilni katalizator koji ubrzava reakciju pri neutralnom pH.<sup>6,7</sup>

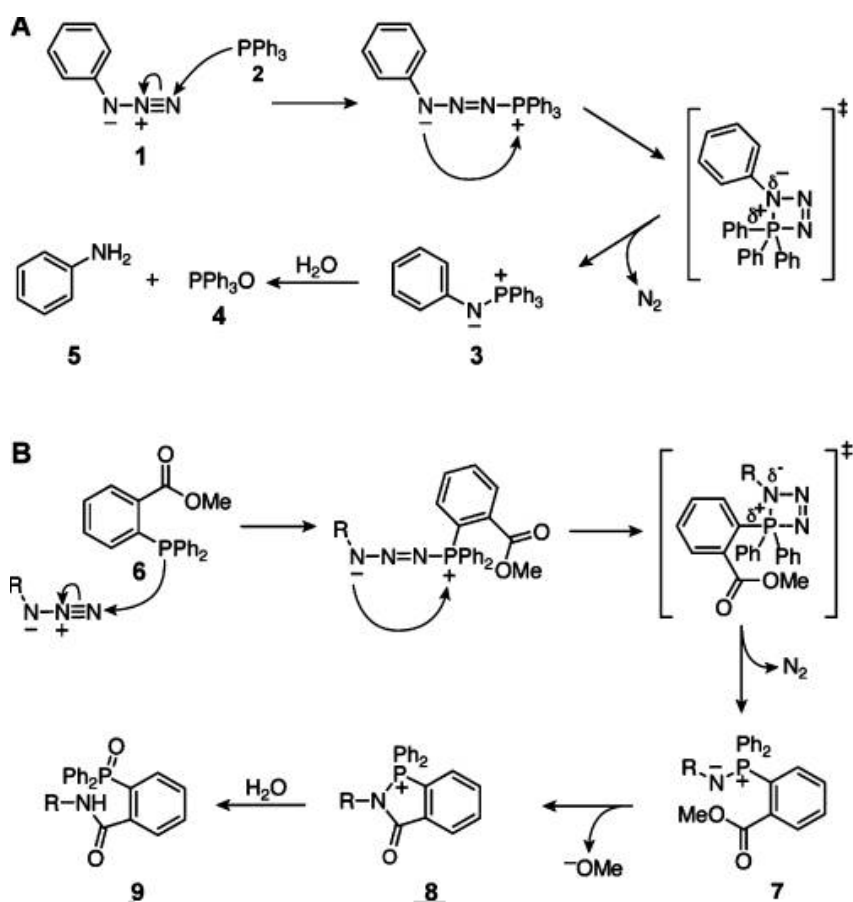
## 2.2. Bioortogonalne reakcije temeljene na azidima

Za razliku od aldehida i ketona, azidi se prirodno ne pojavljuju u stanicama. Azidna skupina je mala i stoga minimalno ometa modificirani supstrat.<sup>4</sup> S obzirom na raspodjelu naboja i strukturu, azidi mogu reagirati na razne načine ovisno u kakvim se uvjetima nalaze, a česta popratna reakcija je oslobađanje dušika.<sup>1</sup> Lako se uvode u biološke molekule, a prati ih velika kinetička stabilnost što su još neke prednost u njihovoj primjeni.<sup>2</sup>

Staudingerova reakcija i azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (I) (CuAAC) su najvažniji primjeri „klik – kemije“ (eng. *click chemistry*).<sup>7</sup> „Klik – kemija“ je pojam koji se uveo 2001.godine,<sup>8</sup> a obuhvaća jednostavnost, učinkovitost i selektivnost određenih reakcija.<sup>4</sup> To su reakcije dvaju reaktanata koji brzo i selektivno reagiraju („klikaju“) i daju jedan produkt u visokom iskorištenju, bez potrebe za pročišćavanjem. „Klik-reakcije“ imaju široku primjenjivost, reaktanti su lako dostupni, a produkti stabilni u fiziološkim uvjetima te se lako izoliraju. Osim dvije navedene reakcije, postoji još primjera klik-reakcija poput Michaelova adicija tiola, Diels-Alderova reakcija s inverznim elektronskim zahtjevom i druge.<sup>9</sup>

## 2.2.1. Staudingerova reakcija

Prateći mehanizam Staudingerove redukcije, vidimo da fosfin(2) nukleofilno napada azid(1) gdje dolazi do izlaska dušika i formiranja aza-ilida (iminofosforan)(3). U vodenom okruženju dolazi da hidrolize aza-ilida pri čemu nastaje oksid fosfora (4) i amin (5). To stvara svojevrсни problem, jer netom stvorena kovalentna veza u aza-ilidu se odmah gubi hidrolizom.<sup>2</sup> Tom problemu se pristupilo tako da se dodala elektrofilna zamka u obliku metilnog estera na arilni prsten koji se nalazi na fosforu. Sada takva molekula (6) napada azid i nastaje međuprodukt (8) koji nakon hidrolize daje stabilan amid (9). Korigirana reakcija je nazvana Staudingerova ligacija.<sup>1</sup> Mehanizam Staudingerove redukcije (A) i Staudingerove ligacije (B) prikazan je na Slici 4.

Slika 4. Mehanizam A) Staudingerove redukcije, B) Staudingerove ligacije<sup>2</sup>

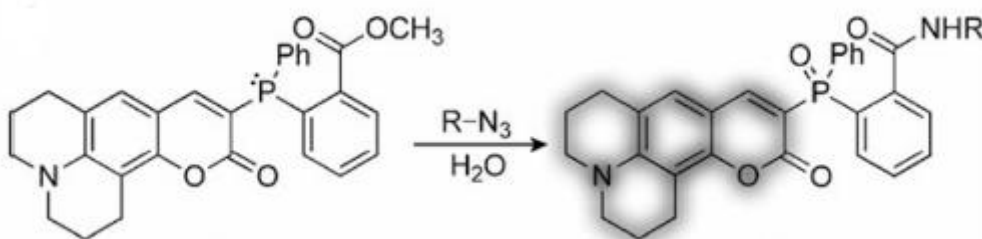
Poput azida, fosfini su također odsutni iz živih sustava.<sup>2</sup> Za razliku od alifatskih, aromatski fosfini su otporniji na oksidaciju pa su češće u uporabi.<sup>1</sup> Bez obzira što je i fosfin odsutan iz živih sustava, azid je lakše ugraditi u glikane, lipide i DNA kemijskim metodama (diazospojevima) ili biosintetski zbog njegove veličine i stabilnosti.<sup>10</sup>

Kao i dosta drugih, Staudingerova reakcija se bazira na reakciji elektrofila s nukleofilom.<sup>11</sup> Azid se ponaša kao „meki elektrofil“ kojeg napada fosfin koji je „meki nukleofil“. To je zanimljivo i dobro iskorišteno jer su većina nukleofila u živim stanicama „tvrđi“.<sup>2</sup> Inače, tvrde elektrofile i nukleofile karakteriziraju mali ionski radijusi, velika elektronegativnost nukleofila te visoko pozitivni naboj elektrofila. Suprotno od njih, meki elektrofil i nukleofil su većeg ionskog radijusa i često su nenabijeni.

Napad fosfina na azid je visoko selektivan što omogućava da se reakcija odvija u vodenom mediju i na samoj površini stanica okruženih raznim biomolekulama.<sup>12</sup> No bez obzira na selektivnost, Staudingerova ligacija pati od spore kinetike.<sup>7</sup>

Uočeno je da početni nukleofilni napad fosfina na azid određuje brzinu reakcije pa se povećanjem gustoće elektrona na fosforu može povećati brzina same reakcije. Ali, da ne bi i to bilo tako jednostavno, dodavanje elektrona na arilne skupine povećava njihovu reaktivnost, a to pak potiče njihovo brže oksidiranje na zraku.

Azidi uvedeni u biomolekule se podvrgnu redukciji s trifenilfosfinom pri čemu se stvara stabilna amidna veza, a vizualizacija se postiže tako da se jedan od arilnih prstenova zamijeni kumarinskom bojom (slika 5). Prilikom oksidacije fosfina dolazi do fluorescencije.<sup>1,4</sup>



Slika 5. Fluorescencija prilikom oksidacije fosfina u Staudingerovoj ligaciji<sup>4</sup>

Staudingerova ligacija koristi se za brojna modificiranja od kojih su neka dalje navedena.

- OZNAČAVANJE GLIKANA

U sintetizirane glikane vrlo uspješno se može ugraditi N-azidoacetilmanozamin koji služi kao kemijski izvjestitelj na koji se mogu vezati fosfinske sonde supstituirane biotinom. Potom se na biotinske sonde dodaje avidin obilježen fluoresceinom što omogućuje vizualizaciju obilježenih glikana.<sup>1,13</sup> Avidin je protein koji pokazuje veliki afinitet prema biotinu. Molekule označene sa azidošećerima reagiraju sa brojnim razvijenim fluorescirajućim fosfinskim reagensima što se potom vizualizira fluorescencijskom mikroskopijom.<sup>1, 10, 14</sup>

Također, osmišljen je način označavanja glikana na površini stanica služeći se bioluminiscencijom. Bioluminiscencija, pojava koja nastaje kada živi organizam emitira vidljivo svjetlo, rezultat je kemijske reakcije u kojoj se molekula luciferina oksidira u oksiluciferin pri čemu se oslobađa svjetlost, a brzinu reakcije određuje prisutnost enzima luciferaze.<sup>15</sup> Prilikom reakcije obilježenog glikana i fosfinskog reagensa supstituiranog s luciferinom dolazi do oslobađanja luciferina. On difundira u stanicu gdje se pretvori u svjetleći oksiluciferin.<sup>1, 10</sup>

- OZNAČAVANJE PROTEINA

S obzirom da su azidi stabilniji pri fiziološkim uvjetima od fosfina, češće se ugrađuju u biomolekule. Azidna skupina može biti uvedena genetskim inženjeringom, posttranslacijskom modifikacijom proteina ili pak ugradnjom aminokiselina koje ju već sadrže.<sup>1</sup>

Kao primjer opisat ćemo uvođenje neprirodne aminokiseline u proteine. Ta metoda oslanja se na dizajniranje jedinstvenog para tRNA i odgovarajuće aminoacil-tRNA-sintetaze. Novostvorena tRNA ne smije biti prepoznata od već postojećih, prirodnih aminoacil-tRNA-sintetaza koje se nalaze u stanici. Ujedno se osmisli odgovarajuća aminoacil-tRNA-sintetaza koja prepoznaje tu novu tRNA i željenu neprirodnu aminokiselinu, a ne prepoznaje niti jednu tRNA niti aminokiselinu koje se prirodno nalaze u stanici. Na ovaj način ova aminoacil-tRNA-sintetaza u stanici omogućuje stvaranje aminoacilirane tRNA koja na sebi ima vezanu neprirodnu aminokiselinu. Ovako aminoaciliranu tRNA koristi ribosom i ugrađuje neprirodnu aminokiselinu u protein. Ovom metodom mogu se uvesti brojne neprirodne aminokiseline u proteine. Tako se mogu uvesti i amonokiseline koje sadrže azide s kojima se kasnije može provoditi Staudingerova ligacija. Vizualizacija se može ostvariti već spomenutom

kumarinskom bojom. Prilikom reakcije s azidom, dolazi do oksidacije fosfora što rezultira povećanjem fluorescencije do 60 puta.<sup>10</sup>

- OZNAČAVANJE LIPIDA NA PROTEINIMA

Kao i glikani, lipidi se isto mogu podvrgnuti modifikaciji s azidom ili alkinom.<sup>16</sup> Lipidacija proteina je posttranslacijski proces, a dvije glavne vrste acilacije proteina su N-miristoilacija glicinskih ostataka uz nastanak stabilne amidne veze i S-palmitoilacija cisteinskih ostataka preko labilne tioesterske veze.<sup>10,17</sup> Označavanje alkinom je povoljno jer alkinske skupine zadržavaju hidrofobnost lanaca masnih kiselina te pritom minimalno mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva masnih kiselina.<sup>17</sup>

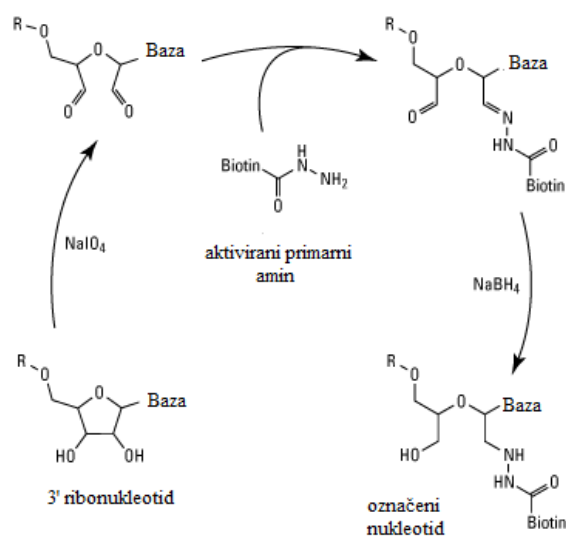
Masne kiseline koje sadrže azid ili alkin na  $\omega$  – položaju posttranslacijski se ugrađuju na stanične proteine te se takvi proteini mogu vizualizirati Staudingerovom ligacijom ili putem CuAAC ligacije<sup>10,17</sup> koja je objašnjena u poglavlju 2.2.2.

- OZNAČAVANJE NUKLEINSKIH KISELINA

Modifikacija DNA uključuje uvođenje nukleotida obilježenog azidom u DNA te ugradnja kemijskih sonda enzimskom modifikacijom DNA. Tako vidimo da se osim glikana, proteina i lipida mogu modificirati i molekule poput DNA. Za nukleinske kiseline postoje kemijski izvjestitelji za selektivno obilježavanje od kojih najčešće korišteni je spomenuti azid pomoću kojeg se potom može provesti Staudingerova ligacija.<sup>10</sup>

Neovisno o DNA, postoje metode za modificiranje isključivo RNA. U tu svrhu najčešće se koriste kalijev ili natrijev perjodat ( $KIO_4$  /  $NaIO_4$ ) koji cijepaju vezu između dva ugljikova atoma na kojima se nalaze hidroksilne skupine stvarajući pritom aldehidne skupine (slika 6). Aldehidne skupine kao takve reagiraju sa primarnim aminima tvoreći Schiffovu bazu koja se reducira s  $NaBH_4$  kako bi nastao stabilniji sekundarni amin. Te reakcije predstavljaju specifičnu reakciju za modificiranje RNA, ali ne i DNA.<sup>30</sup>



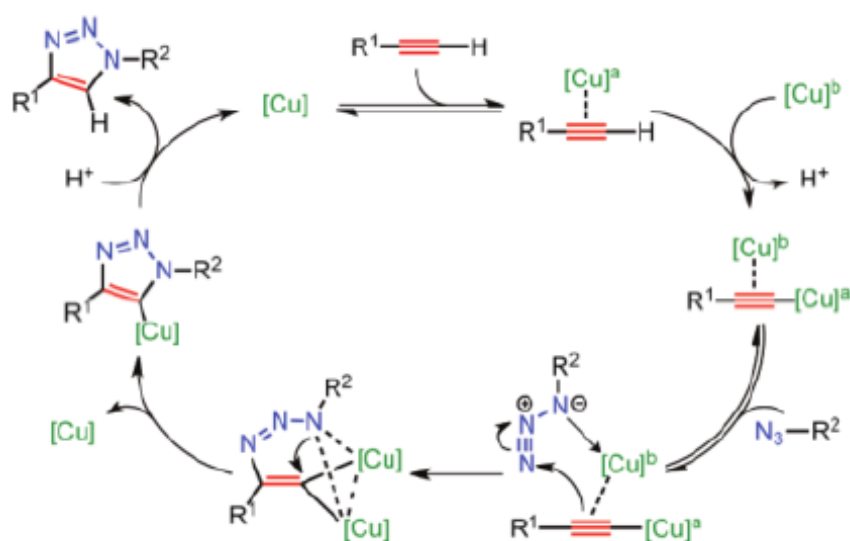


Slika 6. Specifično obilježavanje RNA (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 30).

### 2.2.2. Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (I) (CuAAC)

Alkini, poput azida, se uvode u proteine bez da bitno utječu na njihovu strukturu i funkciju.<sup>10</sup> CuAAC omogućuje reakciju azida i alkina na način da se koristi bakrov acetilid za aktiviranje terminalnih alkina za daljnju reakciju s azidima.<sup>4</sup>

Prije spoznaje da bi bakar poslužio kao dobar katalizator, reakcija se provodila uz povišenu temperaturu i dugo vrijeme reakcije, uz slabu regioselektivnost. Uvođenjem bakra reakcija se ubrzala više od 100 puta što je omogućilo da se provodi na sobnoj temperaturi. Što je još bitnije, poboljšala se i regioselektivnost pri čemu se dobije samo jedan regioizomer.<sup>18</sup>

Slika 7. Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (I) (CuAAC)<sup>9</sup>

U reakciji sudjeluju 2 atoma bakra. Prvi je prisutan u reakciji sa  $\pi$ -vezom alkina, te se potom premješta prilikom deprotonacije i dolaska drugog atoma bakra. Novonastali kompleks potiče napad azida te nastaje 1,2,3-triazol. Jedan bakar napušta kompleks prilikom stvaranja triazola, a drugi odlazi tek nakon protoniranja (slika 7).<sup>9</sup>

CuAAC je najčešće primjenjivana metoda zbog svoje velike učinkovitosti i brze kinetike.<sup>18</sup> No, glavni nedostaci ove reakcije su toksičnost bakra u sustavima *in vivo*. Poznato je da bakar uzrokuje lomove DNA, nastanak reaktivnih kisikovih vrsta te utječe na biološke procese tako što koordinira različite funkcionalne skupine molekula.<sup>9</sup> Razvijeni su neki postupci kojima se može nadvladati toksičnost bakra poput koordiniranja bakra ligandima koji su topivi u vodi ili uvođenjem prstena u alkinski dio. U prvom slučaju, ligandi koordiniraju Cu(I) kako bi se formirao bakreni katalizator koji će i dalje pomicati smjer reakcije u desno pritom smanjujući toksičnost bakra.<sup>7</sup> Drugi slučaj, poznatiji kao azid-alkin cikloadicija potaknuta napetošću prstena (SPAAC), podrazumijeva brzu cikloadiciju između ciklooktina i fenilazida. Tijekom reakcije se oslobađa velika energija što omogućava odvijanje reakcije bez katalizatora.<sup>9</sup> SPAAC se koristi za obilježavanja površine stanice, posebno glikana, čime se omogućava praćenje njihove dinamike. Iako su razvijene metode koje ubrzavaju reakcije, poput uvođenja aromata na ciklooktinski prsten, CuAAC se češće

koristi zbog veće brzine i iskorištenja.<sup>9</sup> Uz to, sinteza ciklooktina je zahtjevna sama za sebe te njegova veličina i hidrofobnost mogu utjecati na stabilnost, strukturu i funkciju proteina.<sup>7</sup>

Ako dođe do oksidacije Cu(I) u Cu(II) reakcija se zaustavlja. Da bi se spriječila oksidacija, Cu(I) se uvodi u obliku soli: CuBr, CuI koje su stabilne u suhim i anaerobnim uvjetima. Ako se pak reakcije provode u vodi uz prisutnost kisika tada se koristi Cu(II) u obliku  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  uz reducens natrijev askorbat u suvišku koji generira Cu(I) *in situ*.<sup>2</sup>

Kao što je već spomenuto, CuAAC se koristi za označavanje glikana na površini stanica, ali i za označavanje fosfolipida, proteina i ostalih biomolekula.<sup>7</sup>

Reakcija po istom principu može biti katalizirana i sa rutenijem da se dobiju disupstituirani triazoli, ali ta se reakcija rjeđe koristi nego CuAAC.<sup>4,9</sup>

## § 3. METODE PROTEINSKE MODIFIKACIJE

Uvođenje neprirodnih aminokiselina je pogodna metoda za postizanje modifikacije proteina na određenom mjestu. No postoje metode koje vrlo dobro modificiraju već prisutne aminokiseline u proteinima bez potrebe za dodatnim uvođenjem neprirodnih aminokiselina.<sup>19</sup>

### 3.1. Modifikacije lizina i cisteina

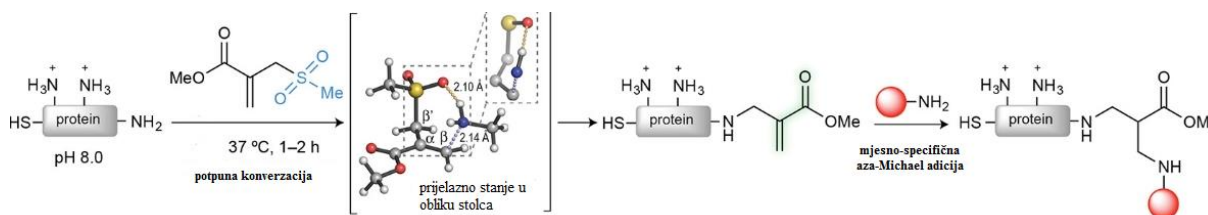
Najčešće modificirane aminokiseline su upravo lizin i cistein.<sup>4</sup> Njihovi nukleofilni ostatci podliježu elektrofilnim reakcijama s različitim reagensima. Iako je zbog svoje jake nukleofilnosti cistein pogodan za reakcije, postoje mnoge zamke u njegovom selektivnom modificiranju. Naime, cistein je vrlo rijedak i prisutan je sa svega 1,9% u sastavu ljudskih proteina. Također, cisteinski ostatci se nalaze u unutrašnjosti samog proteina čime je smanjena njegova dostupnost. Nasuprot njemu, lizinski ostatci čine 5,9 % u ljudskim proteinima. Uz to, lizin se obično nalazi na površini proteina zbog dominantnog ionskog karaktera bočnog lanca koji povećava njihovu topljivost.<sup>1</sup>

#### 3.1.1. Modifikacije lizina

Otkriven je reagens, sulfonil-akrilat, koji selektivno modificira najreaktivniji lizin u proteinu. On je dizajniran tako da cilja  $\epsilon$ -amino skupinu najreaktivnijeg lizina u prisutnosti drugih reaktivnih skupina kao što su tioli cisteina. U nepolarnoj sredini, cisteinski ostatci imaju veće  $pK_a$  vrijednosti tako da je neutralni i manje nukleofilni tiol (R-SH) preferentniji od nukleofinijeg tiolata (R-S<sup>-</sup>). Nasuprot tome, lizinski ostatci u nepolarnim sredinama imaju niže  $pK_a$  vrijednosti pa je prevladavajuća nukleofilna vrsta neutralni amin (R-NH<sub>2</sub>), a ne protonirani amin (R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Ta činjenica ide u prilog regioselektivnoj i kemoselektivnoj modifikaciji lizina jer pri fiziološkom pH tada prevladavaju neutralni lizinski i cisteinski ostatci gdje je naravno nukleofilniji lizinski ostatak preferentniji za reakcije i označavanja.<sup>14</sup>

U reakciji sulfonil-akrilata sa nukleofilnom amino skupinom dolazi do stvaranja vodikove veze koja potiče dodavanje aza-Michael reagensa i uklanjanje metansulfatne izlazne skupine (slika 8). Pokazalo se da aktivirani alken nastao reakcijom sulfonil-akrilata i lizinskog ostatka te spontanom uklanjanjem metansulfinske kiseline može poslužiti u daljnoj

modifikaciji putem polietilen-glikola ili nekih fluorofora. No, još bolji rezultati su postignuti s molekulama koje nose nukleofilni amin te su putem Michaelove reakcije dodani na akrilat koji je inače dobar Michaelov akceptor amina. Upravo je akrilatni dio koji je ostao na proteinu bitan da bi moglo doći do obilježavanja putem Michaelove adicije s molekulama koje sadržavaju amin.<sup>14,20</sup>



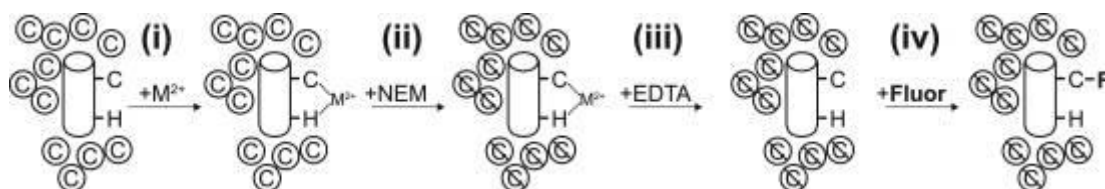
Slika 8. Modifikacija lizina potpomognuta stvaranjem vodikove veze (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 14).

Ova metoda modifikiranja proteina može se provesti na prirodnim proteinskim strukturama s potpunom selektivnošću te ne zahtijeva genetski inženjering. To je svakako od interesa jer ne dolazi do velike promjene aktivnosti unutar same stanice.<sup>20</sup>

### 3.1.2. Modifikacije cisteina

Kada je potrebna jako specifična reakcija, najpouzdanije konjugacije ciljaju upravo cisteinske ostatke.<sup>21</sup> Jedinstvena reaktivnost i mala prisutnost cisteina među aminokiselinama čini ga prikladnim ciljem za obilježavanje proteina npr. sa malim molekulama fluorofora. Reaktivna sulfhidrilna skupina cisteina reagira s različitim elektrofilnim funkcionalnim skupinama fluorofora i modifikatora. No, specifična modifikacija željenog cisteina nije toliko jednostavna. Cistein ili protein od interesa nalazi se okružen brojnim drugim proteinima kao i brojnim drugim cisteinskim ostacima koji nisu predviđeni za označavanje. CyMPL (eng. *Cysteine Metal Protection and Labeling*) je metoda koja omogućava specifično cisteinsko označavanje s minimalnom promjenom unutar samog proteina. Naime, cistein od interesa se reverzibilno zaštititi s metalom iz 12.skupine periodnog sustava elemenata ( $\text{Cd}^{2+}$  ili  $\text{Zn}^{2+}$ ), a

pozadinski cisteini kovalentno reagiraju s nefluorescentnim modifikatorima poput N-etilmaleimida. Potom se metali uklanjaju kompleksiranjem sa EDTA, a specifični cistein je dostupan za reakciju sa fluoroforom kao što je prikazano na slici 9.<sup>22,23</sup>



Slika 9. Specifična metoda zaštite cisteina, CyMPL.<sup>22</sup>

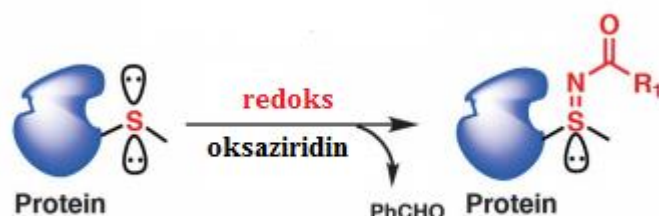
Mogući problem može predstavljati eventualna dugotrajna izloženost cisteinskim modifikatorima jer može doći do oštećenja stanice. Zato je poželjno da reakcije budu obavljene u što je moguće kraćem roku. Isto tako, ako su neki modifikatori previše toksični, postoji nekoliko kovalentnih reagensa s različitim funkcionalnostima za modificiranje cisteina.<sup>22</sup>

### 3.2. Modifikacije metionina

Metionin je jedna od najrjeđih aminokiselina u sastavu proteina te je prisutan sa svega 2,6%.<sup>24</sup> S obzirom na njegovo slabo pojavljivanje i vrlo visok oksidacijski potencijal<sup>25</sup> izuzetno je zanimljiv za selektivnu modifikaciju. Uz to, metionin je jedina aminokiselina koja se može alkilirati u kiselim uvjetima što također ide u prilog njegovom označavanju.<sup>25</sup> Glavni izazov za njegovu modifikaciju predstavlja njegova slaba nukleofilnost pri neutralnim fiziološkim uvjetima jer dolazi do kompeticije s drugim nukleofilnijim aminokiselinama poput cisteina.<sup>26</sup> Uzevši u obzir tu činjenicu jasno je zašto je više proteina s modifikacijama cisteina, lizina, serina i sličnih.<sup>26</sup>

Razvijena je metoda ReACT (redoks-aktivirana kemijska oznaka) koja koristi reagens oksaziridin ( $\text{CH}_3\text{NO}$ ) za prevođenje metioninskog bočnog ogranka u sulfimid, a sam

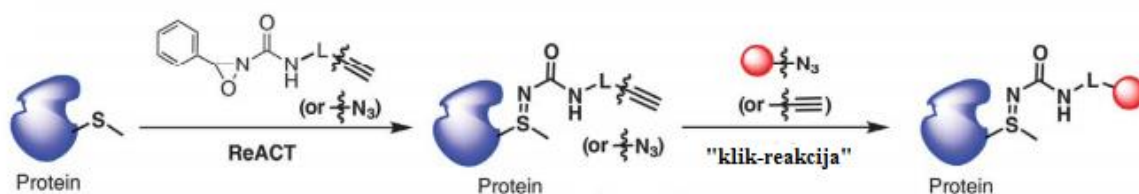
oksaziridin se reducira u aldehid (slika 10).<sup>26,27</sup> Uz sulfimid nastaje i sulfoksid, pa su se morala provesti brojna istraživanja kako dobiti sulfimid u daleko većem iskorištenju.<sup>26</sup>



Slika 10. ReACT metoda obilježavanja metionina (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 26).

Kao što je već rečeno, ova reakcija je selektivna za metionin i ne denaturira proteine.<sup>27</sup> Dobiveni sulfimid metionina je kemijski stabilan u kiselim i bazičnim uvjetima kao i u bioortogonalnim reakcijskim uvjetima.<sup>27</sup> Također je stabilan pri kratkotrajnom izlaganju visokoj temperaturi i raznim redukcijskim sredstvima.<sup>26, 27</sup>

Kako bi se unaprijedila modifikacija metionina, spregnuta je ReACT metoda sa klik-reakcijama (slika 11). Oksaziridinske sonde nose bioortogonalnu alkin ili azid grupu koje dalje reagiraju s biotinom ili nekim fluoroforom.<sup>26</sup>



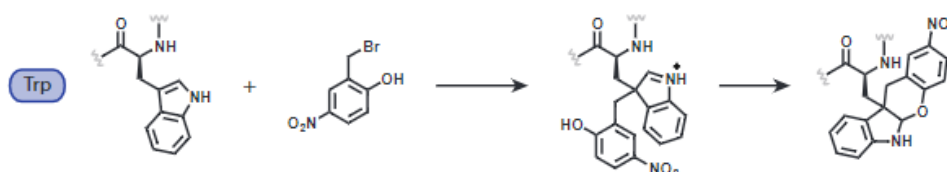
Slika 11. Kombinacija ReACT metode i klik-kemije za obilježavanje metionina (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 26).

### 3.3. Modifikacije triptofana i tirozina

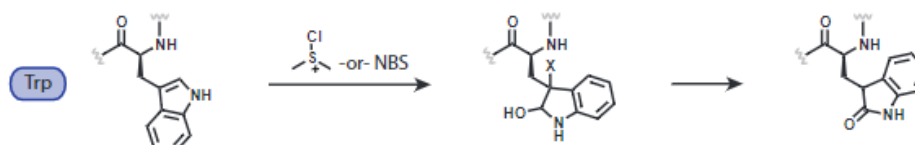
Tirozin i triptofan se ne pojavljuju puno na površini proteina te su često zakopani zbog amfipatske prirode fenolnih i indolnih skupina. Oni ostatci koji su pak dostupni otapalu stvaraju mogućnost pojedinačne modifikacije, naravno uz vrlo dobro proučene reakcijske uvjete.<sup>21</sup>

Postoje reagensi koji ciljaju specifično tirozin ili triptofan. Za triptofan su odavno poznati Koshlandov reagens i elektrofilne halogene vrste kao što su N-bromosukcinimid i dimetil-klorosulfonijev ion. Jodiranje i azo-spojevi koriste se pak za modificiranje tirozina (slika 12). Ove tradicionalne tehnike označavanja tirozina i triptofana služe za određivanje pristupačnosti otapala, kvantificiranje broja triptofanskih i tirozinskih ostataka u proteinima kao i proučavanje njihove uloge u aktivnom mjestu enzima.<sup>19</sup>

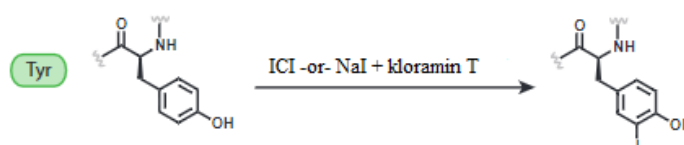
#### a modifikacija sa Koshlandovim reagensom



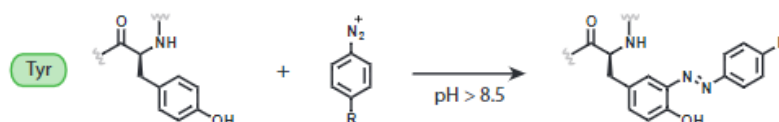
#### b oksidacija sa dimetil-klorosulfonijskim ionom i N-bromosukcinimidom



#### c jodiranje



#### d azo-formacija sa diazonijevom soli



Slika 12. Metode modifikacije triptofana i tirozina (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 19).



U novije vrijeme iskorištavaju se kemijska svojstva aromatskih prstenova bogatih elektronima i njihova osjetljivost na oksidaciju. Pokazalo se da tirozinski i triptofanski ostatci reagiraju s reaktivnim kisikovim vrstama, a akumulacija oksidiranih proteina može biti povezana s raznim poremećajima i starenjem.<sup>19, 21</sup> Naravno, druge aminokiseline isto podliježu oksidaciji, no uz specifične reagense i reakcijske uvjete može se postići selektivnost za tirozinske i triptofanske ostatke.<sup>19</sup>

Između ostalih, izdvaja se metoda koja selektivno modificira tirozin i triptofan korištenjem oksidansa cerij(IV)-amonijeva nitrata (CAN).<sup>19</sup> Derivati anilina bogati elektronima izravno reagiraju sa spomenutim ostatcima. To predstavlja kemoselektivnu modifikaciju proteina pri neutralnom pH, niskim koncentracijama supstrata uz veliko iskorištenje.<sup>21</sup>

### 3.4. Modifikacije na N-kraju

Najlakša modifikacija ostvaruje se kod proteina s jednim polipeptidnim lancem koji posjeduju samo jedan N-terminalni ostatak, koji time predstavlja jedinstveno mjesto za modifikaciju. S obzirom da je N-kraj bazičan i pozitivno nabijen pri fiziološkom pH, ostat će na površini proteina što ga čini dostupnijim za modifikacije. Sa sličnom situacijom smo se sreli kod lizina, ali i kod drugih aminokiselina poput glutamata i aspartata, čiji bočni ogranci su nabijeni pri fiziološkom pH te se nalaze na površini proteina i omogućavaju bolju topljivost proteina. Čak 80,3% N-terminalnih ostataka nalazi se na površini proteina izloženo otapalu.<sup>28</sup>

Najkorištenije modifikacije su N-terminalni metioninski izrez (NME) i N-terminalna acetilacija (NTA). Ako se iza početne aminokiseline, metionina, nalazi jedna od sedam najmanjih aminokiselina (Ala, Gly, Ser, Cys, Val, Pro ili Thr), metionin-aminopeptidaza uklanja početni metionin. Sada se na N-kraju nalazi nova aminokiselina koja se može posttranslacijski dorađivati putem npr. već spomenute N-terminalne acetilacije pomoću N-acetiltransferaze. NME nije strogo vezana uz metionin te se često javlja kod serina, alanina, glicina i treonina.

Ako se na N-kraju nalaze glutamat ili glutamin, oni mogu ciklizirati da tvore piroglutamat i tako sprječavaju daljnju reaktivnost na N-kraju.<sup>28</sup>

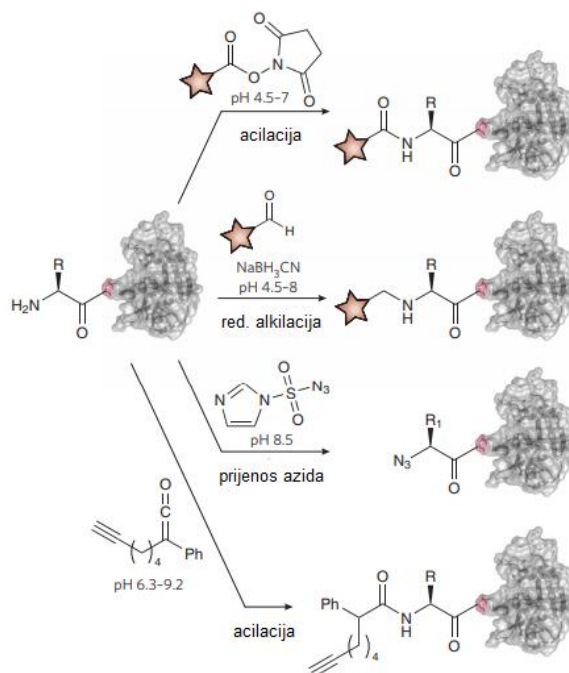
### 3.4.1. Modifikacija N-kraja ovisna o pH

Reakcije na N-terminalnom kraju su uglavnom selektivne kad se izvode pri niskoj pH vrijednosti. Razlog toj selektivnosti leži u bazičnosti N-kraja ( $pK_a = 6-8$ ) koja je niža od bazičnosti nekih aminokiselinskih bočnih ogranaka ( $pK_a \sim 10,5$ ). Pri tom, veliki utjecaj na bazičnost N-kraja ima induktivni utjecaj obližnje karbonilne skupine.

Kao što je prikazano na slici 13 selektivna modifikacija N-kraja može se izvršiti na više načina:

- a) Acilacijom uz uporabu aktiviranog estera gdje N-hidroksisukcinimidni ester (NHS) tvori amidnu vezu
- b) Alkilacijom pomoću reduktivne aminacije aldehida pri čemu nastaje imin
- c) Uvođenjem azida korištenjem diazo reagensa – sniženjem pH sa 11 na 8,5 omogućena je modifikacija N-kraja nasuprot lizinskog bočnog ogranka
- d) Acilacijom pomoću ketena kako bi se uveo alkin – reakcija se izvodi pri  $pH = 6,3 - 9,2$  i pri sobnoj temperaturi

Uvedene alkilne i azidne skupine mogu se dalje modificirati raznim reagensima. Već smo u poglavlju 2.2 spominjali bioortogonalne reakcije na azidima i Staudingerovu reakciju. Kao što smo već napomenuli, reakcijama na N-kraju odgovara niži ili pak neutralni pH. Ako se reakcije izvode pri kiselijim uvjetima, to nudi veći stupanj selektivnosti, ali reakcije često pate od slabog prinosa produkata.<sup>28</sup>



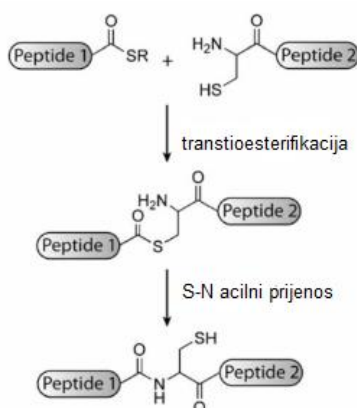
Slika 13. Selektivne metode modifikacije N-kraja ovisne o pH (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 28).

### 3.4.2. Modifikacija N-kraja ovisna o aminokiselinu

#### a) Cistein

N-terminalni cisteini se rijetko javljaju te ih često treba uvesti genetskim inženjeringom. Već spominjana metionin-aminopeptidaza može ukloniti početni metionin kako bi cistein postao novi N-kraj. Isto tako, moguće je određenim proteolitičkim enzimima specifično pocijepati peptidnu vezu prije samog cisteina.<sup>28</sup>

U slučaju cisteinskog ostatka na N-kraju razvijena je nativna kemijska ligacija (NLC) koja uključuje kemoselektivnu kondenzaciju tioestera s N-terminalnim cisteinskim ostatkom kako bi se dobila „nativna“ amidna veza (slika 14).<sup>4</sup> Slijed reakcija je takav da prvo sulfhidrilna skupina cisteina reagira s tioesterom kroz transtioesterifikaciju. Nakon toga slijedi S → N acilni prijenos na N-kraj i stvara se amidna veza.

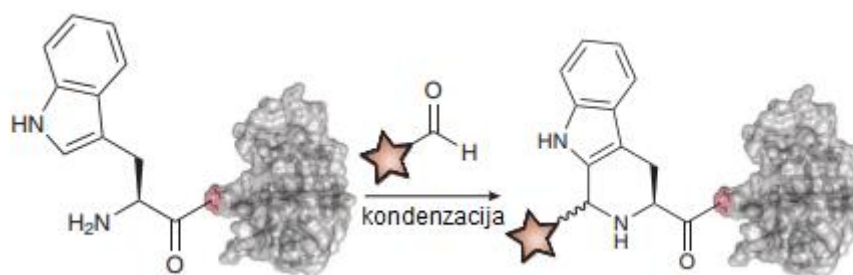


Slika 14. Nativna kemijska ligacija cisteina (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 4).

#### a) Triptofan

Metionin-aminopeptidaza cijepa N-terminalni metionin prije malih aminokiselina, ali ne i ispred velikog triptofana. U tom slučaju, do triptofana na N-kraju se može doći sintetiziranjem ili proteolitičkim cijepanjem peptida. Naknadno je napravljena varijanta metionin-aminotransferaze koja omogućava uklanjanje metionina prije velikih i kiselih aminokiselina poput triptofana.

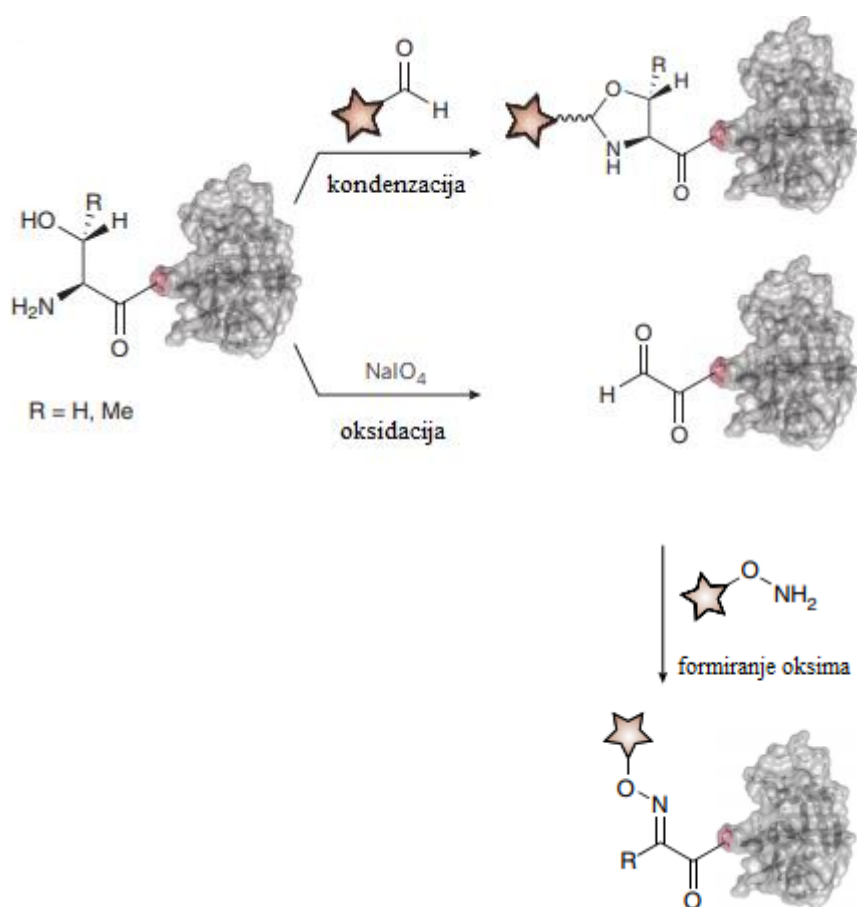
Indolna skupina triptofana i njegov N- kraj ciklički se kondenzira s aldehidom pri čemu nastaje nova C-C veza (slika 15). Reakcija je poznata kao Pictet-Spenglerova.<sup>28</sup>



Slika 15. Pictet - Spenglerova reakcija (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 28).

## a) Serin i treonin

N-terminalni krajevi serina i treonina također se mogu ciklički kondenzirati s aldehidom poput triptofana. Tako se formira oksazolidin, no on je sklon hidrolizi ovisno o pH. Označavanju se zato može pristupiti na drugi način korištenjem natrijeva perjodata ( $\text{NaIO}_4$ ) pri čemu dolazi do oksidacijskog cijepanja i formiranja terminalnih aldehida. Aldehid se može dalje modificirati s alkoksaminom da bi nastao oksim (slika 16).<sup>28</sup>



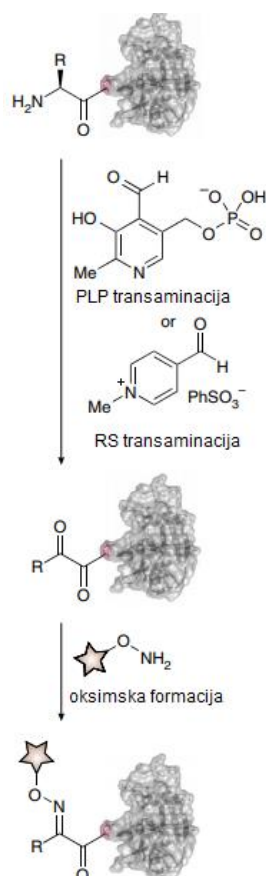
Slika 16. Metode modificiranja serina i treonina (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 28).

## 3.4.3. N-terminalna modifikacija kroz transaminaciju

Piridoksal-5'-fosfat (PLP) poznatiji kao B6 je prostetička skupina svih aminotransferaza. Najvažnija skupina PLP-a je aldehidna skupina koja tvori Schiffovu bazu sa  $\epsilon$ -amino skupinom lizina.<sup>29</sup>

No, s obzirom da N-terminalni kraj ima nižu  $pK_a$  vrijednost od  $\epsilon$ -amino skupine lizina, doći će do formiranja imina isključivo na N-kraju. Slijedi hidroliza nastalog imina i transaminacija u karbonilnu skupinu na N-kraju. Kao i u gornjem poglavlju, karbonilna skupina se može modificirati sa derivatima alkoksiamina (slika 17).

Za razliku od N-terminalne oksidacije serina i treonina, transaminacija posredovana piridoksal-5'-fosfatom je puno brža i neovisna o N-terminalnoj aminokiselini.<sup>28</sup>



Slika 17. Transaminacija N-kraja uz piridoksal-5'-fosfat (slika preuzeta i prilagođena prema referenci 28).

## § 4. ZAKLJUČAK

Bioortogonalna kemija omogućila je razvoj novih strategija koje daju uvid u složene stanične procese. Brojna istraživanja stvorila su podlogu za provođenje kontroliranih reakcija u prisutnosti mnogih funkcionalnih skupina u samim stanicama. Među prvim bioortogonalnim reakcijama bila je Staudingerova ligacija koja se pokazala kao izuzetno korisna metoda za označavanje biomolekula u njihovom prirodnom okruženju. Također, korisna je i kao metoda za modifikaciju stanične površine. Traženjem efikasnijih reakcija i boljih rezultata došlo se do azid-alkin cikloadicije katalizirane bakrom (I) (CuAAC) kao nove metode biokonjugacije. Interesantnom je čini veća brzina reakcije, ali i korištenje alkina i azida kao kemijskih izvjestitelja naspram fosfina u Staudingerovoj ligaciji čija je mana podložnost oksidaciji. S obzirom na toksičnost bakra, CuAAC metoda ima ograničenja, no ta metoda se i dalje optimizira kako bi se mogli pratiti dinamični procesi u organizmu.

Velika prisutnost proteina u samim stanicama nudi razne mogućnosti modificiranja, no isto tako i veliku nespecifičnost. Naime, s obzirom na brojnost određenih aminokiselina u samim proteinima, dosta je teško razviti specifične metode koje će obilježiti ciljanu aminokiselinu kao što je slučaj s lizinom. Zbog brojnosti proteina i njihovih funkcionalnih skupina pomalo su u stranu stavljene druge biomolekule pa se još uvijek traže optimalne metode modifikacija lipida, glikana i nukleinskih kiselina koje će se odmaknuti od onih standardnih, dobro proučenih načina obilježavanja. Kako god, niti jedna od bioortogonalnih reakcija nije potpuno savršena u živim stanicama tako da gdje ima nedostataka ima i mjesta za napredak.

Konačno, san svih znanstvenika je uvesti nebiološke reakcije u biološke kemijske sustave kako bi se mogla pratiti dinamika samih staničnih procesa. Radi se na poboljšanju kinetike i selektivnosti reakcija kao i na traženju novih strategija modificiranja koja će minimalno ometati funkcije ciljanih biomolekula.

## § 5. LITERATURNI IZVORI

1. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:819375> (Datum pristupa 15.03.2018.)
2. E.M. Sletten ,C.R. Bertozzi , From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions, *Acc. Chem. Res.* **44** (2011) 666-676.
3. C.S. McKay, M.G. Finn, Click chemistry in complex mixtures: bioorthogonal bioconjugation, *Chem. Biol.* **21** (2014) 1075-1101.
4. E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **48** (2009) 6974-6998.
5. P. Shieh,C.R. Bertozzi, Design strategies for bioorthogonal smart probes, *Org. Biomol. Chem.* **12** (2014) 9307-9320.
6. Y. Gong, L. Pan , Recent advances in bioorthogonal reactions for site-specific protein labeling and engineering, *Elsevier Ltd.* **56** (2015) 2123-2132.
7. C. S.M. Fernandes, G.D.G. Teixeira, O. Iranzo, A. C.A. Roque, Engineered Protein Variants for Bioconjugation, *Elsevier Inc.* (2018) 105-138.
8. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 2004-2021.
9. N.Tir, Bioortogonalne klik-reakcije, Kemijski seminar I, Prirodoslovno- matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (2017)
10. S.S.van Berkel, M.B. van Eldijk, J.C. van Hest, Staudinger ligation as a method for bioconjugation, *Angew Chem Int Ed Engl.* **50** (2011) 8806-8827.
11. M. Köhn, R. Breinbauer, The Staudinger ligation-a gift to chemical biology, *Angew Chem Int Ed Engl.* **43** (2004) 3106-3116.
12. E. Saxon, J. Armstrong, C.R.Bertozzi, A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bond, *Org.Lett.* **2** (2000) 2141-2143.
13. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/staudinger-ligation-reaction-chemistry.html> (datum pristupa 10.08.2018.)
14. M.J. Matos, B.L. Oliveira, N. Martínez-Sáez, A. Guerreiro, Cal P. M. S. D., J.Bertoldo, M. Maneiro, E. Perkins , J. Howard, M.J. Deery, J.M. Chalker, F. Corzana, G. Jiménez-



- Osés, G.J.L. Bernardes, Chemo- and Regioselective Lysine Modification on Native Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **140** (2018) 4004-4017.
15. Angewandte Chemie International Edition, Rapid Staudinger Ligation on Cell Surfaces, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* (2017)
16. H. C. Hang, J. P. Wilson, G. Charron, Bioorthogonal chemical reporters for analyzing protein lipidation and lipid trafficking, *Acc. Chem. Res.* **44** (2011) 699-708.
17. R. N. Hannoush, N. Arenas-Ramirez, Imaging the Lipidome:  $\omega$ -Alkynyl Fatty Acids for Detection and Cellular Visualization of Lipid-Modified Proteins, *ACS Chem. Biol.* **4** (2009) 581-587.
18. L.Li, Z.Zhang, Development and Applications of the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) as a Bioorthogonal Reaction, *Molecules* **21** (2016) 1393.
19. K.L.Seim, Development of Oxidative Bioconjugation Methodology for the Site-Selective Modification of the Electron Rich Aromatic Amino Acids, *UC Berkeley*, (2013)
20. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, 2nd Edition, *Oxford University*, 2012, str. 500
21. K. L. Seim, A. C. Obermeyer, M. B. Francisa, Oxidative modification of native protein residues using cerium(IV) ammonium nitrate, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 16970-16976.
22. M.C. Puljung, W.N. Zagotta , Fluorescent labeling of specific cysteine residues using CyMPL, *Curr Protoc Protein Sci.* **14** (2012)
23. M.C. Puljung, W.N. Zagotta , Labeling of specific cysteines in proteins using reversible metal protection, *Biophys. J.* **100** (2011) 2513-2521.
24. R.L.Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 4th Edition, *CRC Press*, 2014, str. 377
25. J.N. de Gruyter, L.R. Malins, P.S. Baran, Residue-Specific Peptide Modification: A Chemist's Guide, *Biochemistry* **56** (2017) 3863-3873.
26. S.Lin, X.Yang, S. Jia , A.M. Weeks , M.Hornsby, P.S.Lee, R.V.Nichiporuk, A.T. Iavarone , J.A. Wells, F.D. Toste, C.J.Chang, Redox-based reagents for chemoselective methionine bioconjugation, *Science* **355** (2017) 597-602.
27. C. Deane, Bioconjugation: Methionine's time to shine, *Nat. Chem. Biol* **13** (2017) 343-343.

28. C. B. Rosen, M. B. Francis, Targeting the N terminus for site-selective protein modification, *Nat. Chem. Biol* **13** (2017) 697-705.
29. J.M.Berg, J.L.Tymoczko, L.Stryer, Biokemija, 6. izdanje, *Školska knjiga*, Zagreb (2013)
30. <https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/methods-labeling-nucleic-acids.html> (datum pristupa 28.08.2018.)