

Mgr Anna Wychowaniec

## **Wieloanalitowe fluorescencyjne sondy małowcząsteczkowe do badania biologicznie istotnego lokalnego mikrośrodowiska**

Komórki można porównać do nano-fabryk, w których kompartmentalizacja umożliwia zachodzenie przeciwstawnych procesów w tym samym czasie. Pomimo wieloletnich badań, szczegółowy wgląd w czasie rzeczywistym w te reakcje i poszczególne zmiany w nano-środowisku komórek pozostaje wyzwaniem. Obecnie dostępne metody koncentrują się głównie na określaniu zmian w całym regionie (np. organelle) lub nie są możliwe do wdrożenia *in cellulo*, bez zakłócania całego systemu i utraty wielu informacji (np. przy izolacji i testach *in vitro* makročząsteczek). Uzyskanie bardziej szczegółowego obrazu na poziomie nanometrów zmieni sposób, w jaki patrzymy na procesy fizjologiczne i patologiczne, przybliżając nas do precyzyjnego zrozumienia i leczenia na poziomie molekularnym.

Środowisko wewnątrzkomórkowe podlega wielu zmianom jednocześnie. Obserwacja tych zmian jest w dużej mierze niemożliwa bez użycia specjalistycznych narzędzi, ponieważ większość elementów środowiska komórkowego nie generuje wykrywalnego sygnału. Jedną z takich metod zapewniających doskonałą rozdzielczość i powodujących minimalne zakłócenia homeostazy komórek jest obrazowanie fluorescencyjne. W szczególności, wrażliwe na środowisko narzędzia fluorogeniczne mają ogromny potencjał w monitorowaniu zmian, które w innym przypadku nie byłyby obserwowalne. Sondy fluorogeniczne stają się fluorescencyjne dopiero po interakcji z wybranym analitem, co pozwala na bardziej wiarygodne obrazowanie bez konieczności ich usuwania (tzw. „no-wash” znakowanie).

Aby uzyskać informacje na temat określonego celu (np. enzymu), sondy mogą być kowalencyjnie przyłączone do celu molekularnego. Jedną z najbardziej obiecujących metod znakowania opisanych w literaturze jest znakowanie oparte na powinowactwie. Sondy te składają się z trzech komponentów: odwracalnego liganda selektywnego względem białka (celu), grupy reaktywnej (podatnej na atak wybranego aminokwasu na białku) oraz części reporterowej (fluoroforu). Sondy te oferują selektywne znakowanie fluorescencyjne białek bez potrzeby modyfikacji genetycznej, umożliwiając potencjalną obserwację naturalnej aktywności celu. Teoretycznie sondy te mogą dostarczać informacji o analitach w mikrośrodowisku celu, umożliwiając obserwacje w czasie rzeczywistym, *in cellulo*, przy użyciu zaawansowanego obrazowania (np. mikroskopii superrozdzielczej). Jak dotąd nie osiągnięto jednak dodatkowego wykrywania analitów wokół określonych celów z użyciem tej technologii.

Głównym celem niniejszej pracy było zaprojektowanie, synteza i walidacja dwóch fluorogenicznych cząsteczek wrażliwych na środowisko i przekształcenie jednej z nich w opartą na powinowactwie sondę znakującą dla hCAII w celu wykrycia wybranego analitu (zmiany pH). Aby opracować takie sondy, przeprowadzono kompleksowy przegląd literatury w celu zidentyfikowania dwóch odpowiednich fluoroforów: 4-sulfonamidu benzo[c][1,2,5]oksadiazolu i 1,8-naftalimidu. Synteza docelowych sond opierała się na ustalonych metodach literaturowych, a wybrane fluorofory zostały zsyntetyzowane i wykorzystane do wytworzenia dwóch sond: SOLpH1 i SOLpH2 (potwierdzone metodami  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR i HRMS). Sondy te zostały tak zaprojektowane, aby były fluorogeniczne i wrażliwe na zmiany fizykochemiczne w ich najbliższym mikrośrodowisku (zmiany pH i/lub zmiany polarności). Ich fluorogeniczna natura była bezpośrednio związana z ich

właściwościami wykrywania pH. Obie cząsteczki posiadają pierścień piperazynowy, z jedną wolną parą na atomie azotu niezaangażowaną w  $\pi$ -sprężone układy aromatyczne. Przy wysokim pH sondy nie powinny emitować fluorescencji lub fluoryzować słabo z powodu wygaszania PeT. Gdy pH mikrośrodowiska spada, azot ulega protonowaniu i obserwuje się wzrost fluorescencji.

Zmierzono emisję sond oraz ich wrażliwość na polarność i lepkość w obecności zestawu biologicznie istotnych analitów. Podstawowe właściwości fotofizyczne (wydajność kwantowa fluorescencji, współczynnik ekstynkcji, jasność) zostały określone dla obu sond przy dwóch różnych wartościach pH (4,0 i 7,5) z wykorzystaniem wzorców o znanych właściwościach. Przeprowadzono eksperymenty kolokalizacji z trackerami mitochondriów i lizosomów w dwóch różnych liniach komórkowych (zdrowej HEK293T i nowotworowej A549). Ostatnim krokiem była wewnątrzkomórkowa detekcja pH w linii komórkowej HEK293T. SOLpH1 został następnie wprowadzona do sondy znakowanej powinowactwem, SOLpH1-Tos. Sondę SOLpH1-Tos inkubowano z jej potencjalnym celem, hCAII (48 godzin), mieszaninę poddano trawieniu trypsyną, a uzyskane peptydy przeanalizowano w celu zidentyfikowania możliwych miejsc znakowania. Na koniec zbadano właściwości detekcji pH i aktywność enzymatyczną znakowanego białka SOLpH1-hCAII. Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły oczekiwane właściwości nowych struktur fluoroforowych. Obie sondy wykazały właściwości pH-czułe ze wzrostem emisji pomiędzy pH=4.0 i pH=8.0 (14-krotny wzrost SOLpH1 (exc/em 420/600 nm) i 13-krotny wzrost dla SOLpH2 (exc/em 390/530 nm). Ich obliczone  $pK_a$  wynosiło odpowiednio 6.4 (SOLpH1) i 6.5 (SOLpH2), co czyni je odpowiednimi do zastosowań in cellulo. SOLpH1 wykazał większe zmiany przesunięcia Stokesa między dwoma najbardziej polarnymi rozpuszczalnikami/roztworami i wykazał wyższą intensywność emisji wraz ze spadkiem polarności rozpuszczalnika. SOLpH2, z drugiej strony, zachował się w przeciwny sposób. Podczas gdy zarówno SOLpH1, jak i SOLpH2 reagują na zmiany lepkości, w bardziej lepkich środowiskach SOLpH1 wykazuje 12,5-krotny wzrost intensywności emisji, podczas gdy SOLpH2 wykazuje fluktuacje intensywności emisji wraz ze zmianą lepkości. Eksperymenty kolokalizacyjne nie wykazały preferencji sond do lokalizacji w mitochondriach lub lizosomach. Co więcej, obie sondy były w stanie z powodzeniem monitorować wewnątrzkomórkowe zmiany pH.

Dokładne analizy uzyskanych danych doprowadziły do wyboru SOLpH1 do dalszego rozwoju w kierunku sondy znakującej opartej na powinowactwie, SOLpH1-Tos. SOLpH1-Tos składa się z krótkiego łącznika z glikolu etylenowego, grupy reaktywnej tosylian/tosyl, łącznika kadawerynowego i odwracalnego inhibitora hCAII, benzenosulfonamidu. Eksperyment znakowania in vitro ludzkiej anhidrazy węglanowej II za pomocą sondy SOLpH1-Tos zakończył się sukcesem, a analiza uzyskanych danych potwierdziła reakcję zachodzącą między SOLpH1-Tos a aminokwasem znajdującym się w pobliżu miejsca aktywnego enzymu (histydyna His64 przy wejściu do miejsca aktywnego białka, w przeciwieństwie do His67 w publikacji źródłowej). SOLpH1-Tos jest, zgodnie z posiadaną przez nas wiedzą, pierwszą sondą wrażliwą na pH do znakowania białek docelowych w oparciu o powinowactwo, bez konieczności stosowania genetycznie zakodowanego znacznika. Ta nowa sonda wykazuje użyteczność cząsteczki w eksperymentach opartych na pH, a po przyłączeniu do ludzkiej anhidrazy węglanowej II może zapewnić wgląd w niewielkie zmiany pH w bezpośredniej bliskości miejsca aktywnego enzymu. Takie lokalne zmiany pH mogą być istotne dla funkcji białka, potencjalnie kluczowe dla procesów fizjologicznych i patologicznych.