

Metody značení a imobilizace biomolekul

Petr Skládal

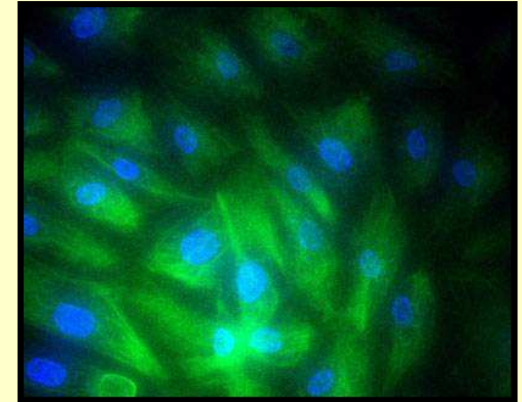
**Ústav biochemie PŘF MU
Kamenice 5, Brno**

skladal@chemi.muni.cz

Úvod

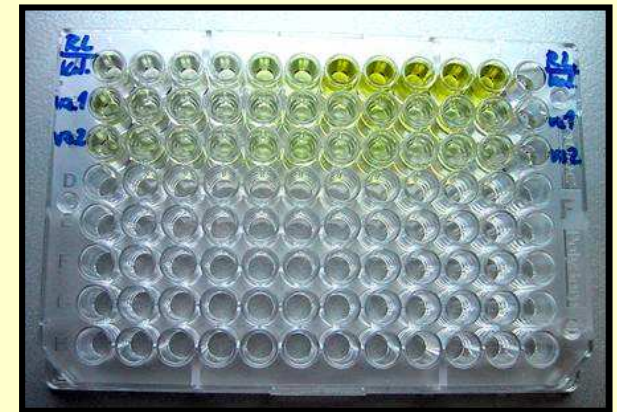
■ modifikace biomolekul:

- vzájemné spojování
- zavádění vhodných značek
- navázání na pevný povrch (separační materiály, mg. částice, sensory, ...)



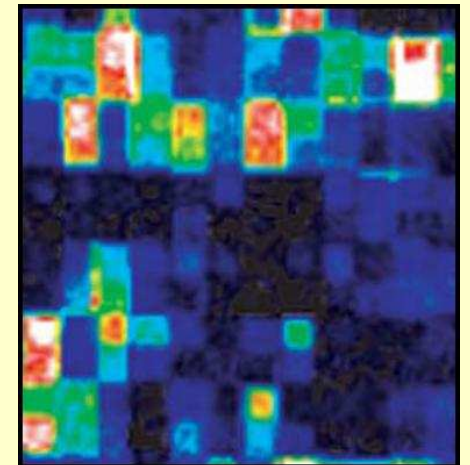
■ základ řady moderních:

- vědeckých výzkumných metod
- bioanalytických procesů
- terapeutických postupů



■ často zmiňovány jen okrajově

- cílem přednášky je podat ucelený pohled na tuto problematiku



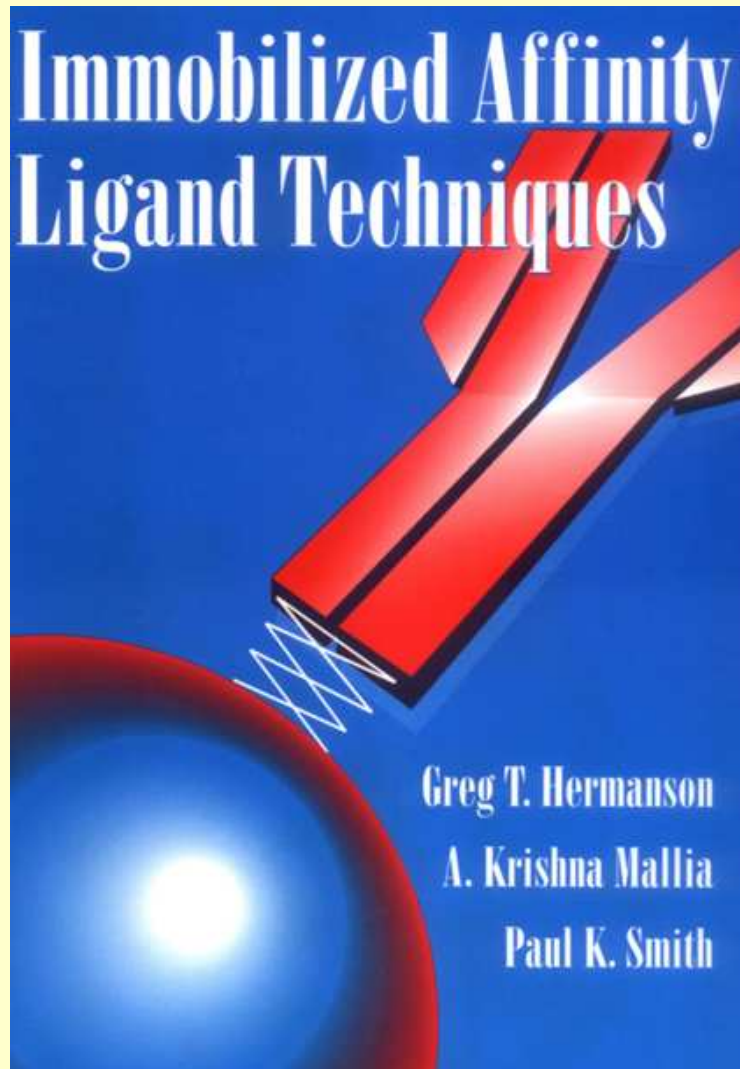
Souhrn přednášky

- 1. Modifikace proteinů a peptidů.**
- 2. Funkční skupiny nukleotidů, modifikace DNA a RNA. Modifikace (poly)sacharidů.**
- 3. Chemické reakce vybraných skupin biomolekul.**
- 4. Biokonjugační reakce, zesít'ující činidla. Štěpitelné můstky.**
- 5. Fluorescenční značky.**
- 6. Biotinylace, chelatační skupiny, histidinové skupiny, boronátové komplexy. Radioaktivní značení. Liposomy, nanočástice.**
- 7. Enzymové značky, metodiky značení a detekce aktivity.**
- 8. Imobilizace biomolekul. Aktivace matric, polymerní materiály, porézní skleněné nosiče.**
- 9. Aktivace povrchu zlata, platiny, uhlíku a křemíku. Spontánní vznik monovrstev, fotoaktivace.**
- 10. Charakterizace biokonjugátů - stupeň substituce, povrchová hustota ligandu.**
- 11. Aplikace: konjugace haptenu s nosiči, značení protilátek.**
- 12. Aplikace: imobilizace proteinů na povrch zlata, příprava DNA biočipů.**

Literatura

- **P. Skládal: Metody značení a imobilizace biomolekul. Elektronický text (PDF), MU Brno, 2017(?).**
- **Lowe C.R., Dean P.D.G.: Afinitní chromatografie. SNTL, Praha 1979.**
- **Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K.: Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, San Diego, CA, 1992.**
- **Hermanson G.T.: Bioconjugate Techniques. Academic Press, San Diego, CA, 1996.**
- **C.M. Niemeyer: Bioconjugation Protocols, Strategies and Methods. Humana Press, Totowa, NJ, 2004**
- **internetové zdroje - webové stránky dodavatelů reagensií (Pierce, Sigma, ...)**

Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K.: Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, San Diego, 1992.



- The matrix
- Activation methods
- Immobilization of ligands
- Techniques of the trade
- Selected applications

Hermanson G.T.: Bioconjugate Techniques. Academic Press, San Diego, 1992 - 2008.

PART I

Bioconjugate Chemistry

1. Functional Targets
2. The Chemistry of Reactive Groups

PART II

Bioconjugate Reagents

3. Zero-Length Crosslinkers
4. Homobifunctional Crosslinkers
5. Heterobifunctional Crosslinkers
6. Trifunctional Crosslinkers
7. Dendrimers and Dendrons
8. Cleavable Reagent Systems
9. Fluorescent Probes
10. Bifunctional Chelating Agents and Radioimmunoconjugates
11. Biotinylation Reagents
12. Iodination Reagents
13. Silane Coupling Agents
14. Microparticles and Nanoparticles
15. Buckyballs, Fullerenes, and Carbon Nanotubes
16. Mass Tags and Isotope Tags
17. Chemoselective Ligation: Bioorthogonal Reagents
18. Discrete PEG Reagents

PART III

Bioconjugate Applications

19. Preparation of Hapten–Carrier Immunogen Conjugates
20. Antibody Modification and Conjugation
21. Immunotoxin Conjugation Techniques
22. Preparation of Liposome Conjugates and Derivatives
23. Avidin–Biotin Systems
24. Preparation of Colloidal Gold-Labeled Proteins
25. Modification with Synthetic Polymers
26. Enzyme Modification and Conjugation
27. Nucleic Acid and Oligonucleotide Modification and Conjugation
28. Bioconjugation in the Study of Protein Interactions

PART I

Bioconjugate Chemistry

1. Functional Targets 3
2. The Chemistry of Reactive Groups 137

PART II

Bioconjugate Reagents

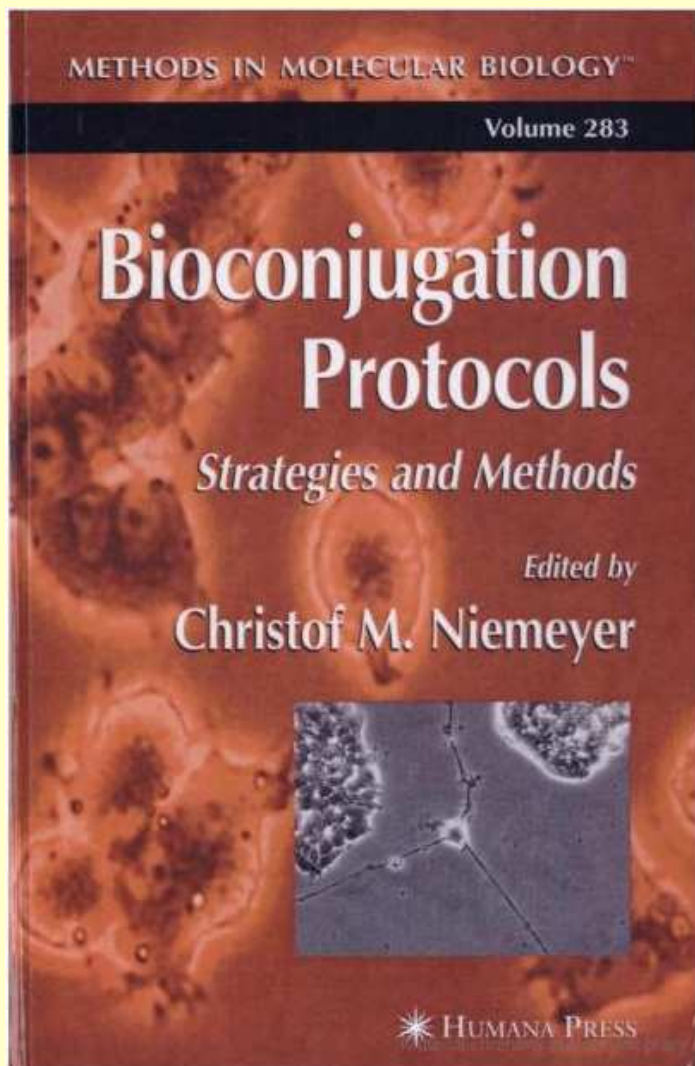
3. Zero-Length Cross-linkers 169
4. Homobifunctional Cross-linkers 187
5. Heterobifunctional Cross-linkers 228
6. Trifunctional Cross-linkers 287
7. Cleavable Reagent Systems 292
8. Tags and Probes 297

PART III

Bioconjugate Applications

9. Preparation of Hapten–Carrier Immunogen Conjugates 419
10. Antibody Modification and Conjugation 456
11. Immunotoxin Conjugation Techniques 494
12. Preparation of Liposome Conjugates and Derivatives 528
13. Avidin–Biotin Systems 570
14. Preparation of Colloidal-Gold-Labeled Proteins 593
15. Modification with Synthetic Polymers 605
16. Enzyme Modification and Conjugation 630
17. Nucleic Acid and Oligonucleotide Modification and Conjugation 639

C.M. Niemeyer: Bioconjugation Protocols, Strategies and Methods. Humana Press, Totowa, NJ, 2004



Contents

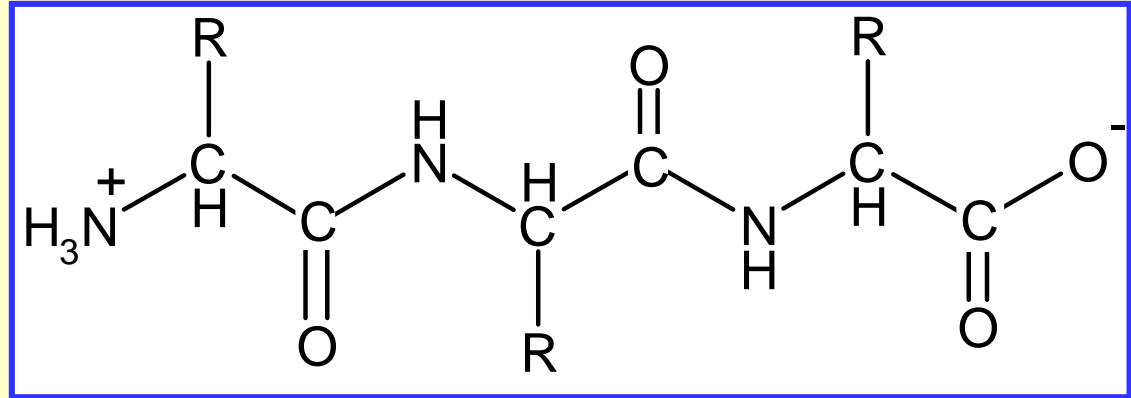
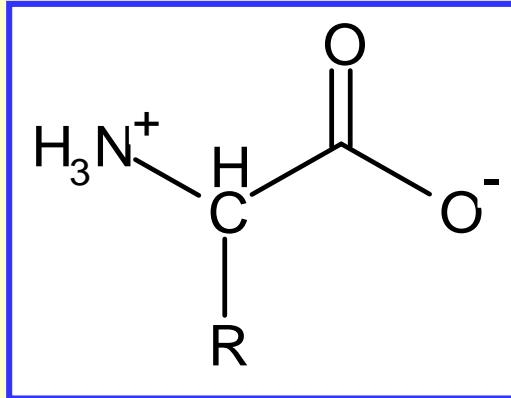
Preface	v
Contributors	ix
PART I ANTIBODY AND ENZYME CONJUGATES	
1 Streptavidin–Biotin Crosslinking of Therapeutic Enzymes With Carrier Antibodies: <i>Nanoconjugates for Protection Against Endothelial Oxidative Stress</i> <i>Vladimir V. Shuvaev, Thomas Dziubla, Rainer Wiewrodt, and Vladimir R. Muzykantov</i>	3
2 Characterization of Endothelial Internalization and Targeting of Antibody–Enzyme Conjugates in Cell Cultures and in Laboratory Animals <i>Silvia Muro, Vladimir R. Muzykantov, and Juan-Carlos Murciano</i>	21
3 Smart Polymer–Streptavidin Conjugates <i>Patrick S. Stayton, Zhongli Ding, and Allan S. Hoffman</i>	37
4 Conjugates of Peptides and Proteins to Polyethylene Glycols <i>Margherita Morpurgo and Francesco M. Veronese</i>	45
5 Chemical Production of Bispecific Antibodies <i>Robert F. Graziano and Paul Cuptill</i>	71
6 Preparation of Immunoconjugates Using Antibody Oligosaccharide Moieties <i>Cari-Wilhelm Vogel</i>	87
7 Synthesis of Hapten–Protein Conjugates Using Microbial Transglutaminase <i>Markus Meusel</i>	109
PART II NUCLEIC ACID CONJUGATES	
8 Fluorescent Sample Labeling for DNA Microarray Analyses <i>Verena Beier, Andrea Bauer, Michael Baum, and Jörg D. Hoheisel</i>	127
9 High-Density Labeling of DNA for Single Molecule Sequencing <i>Susanne Brakmann</i>	137
10 Sequence-Specific DNA Labeling Using Methyltransferases <i>Goran Pjivaljčić, Falk Schmidt, Alexander Peschlow, and Elmar Weinhold</i>	145
11 Hapten Labeling of Nucleic Acids for Immuno-Polymerase Chain Reaction Applications <i>Michael Adler</i>	163

vii

viii	Contents
12 Covalent Coupling of DNA Oligonucleotides and Streptavidin <i>Florian Kukolka, Marina Lovrinovic, Ron Wacker, and Christof M. Niemeyer</i>	181
13 Synthesis of Oligonucleotide–Peptide and Oligonucleotide–Protein Conjugates <i>David R. Corey</i>	197
14 Synthesis of Peptide Nucleic Acid–Peptide Conjugates <i>Kunihiko Kaihatsu and David R. Corey</i>	207
PART III GLYCOSYL AND LIPID CONJUGATES	
15 Protein Lipidation <i>Jürgen Kuhlmann</i>	217
16 Synthesis of Lipidated Peptides <i>Ines Heinemann, Martin Völkert, and Herbert Waldmann</i>	221
17 In Vitro Semisynthesis and Applications of C-Terminally Modified Rab Proteins <i>Thomas Durek, Roger S. Goody, and Kirill Alexandrov</i>	233
18 Generation and Characterization of Ras Lipoproteins Based on Chemical Coupling <i>Melanie Wagner and Jürgen Kuhlmann</i>	245
19 Conjugation of Glycopeptide Thioesters to Expressed Protein Fragments: <i>Semisynthesis of Glycosylated Interleukin-2</i> <i>Thomas J. Tolbert and Chi-Huey Wong</i>	255
20 Subtilisin-Catalyzed Glycopeptide Condensation <i>Thomas J. Tolbert and Chi-Huey Wong</i>	267
PART IV BIOFUNCTIONALIZATION OF SURFACES	
21 Peptide Nucleic Acid Microarrays <i>Anette Jacob, Ole Brandt, Achim Stephan, and Jörg D. Hoheisel</i>	283
22 Synthesis and Characterization of Deoxyribonucleic Acid-Conjugated Gold Nanoparticles <i>Pompi Hazarika, Tatiana Giorgi, Martina Reibner, Buelent Ceyhan, and Christof M. Niemeyer</i>	295
23 Biofunctionalization of Carbon Nanotubes for Atomic Force Microscopy Imaging <i>Adam T. Woolley</i>	305
Index	321

Modifikace peptidů a proteinů

- aminokyseliny spojené navzájem peptidovou vazbou:



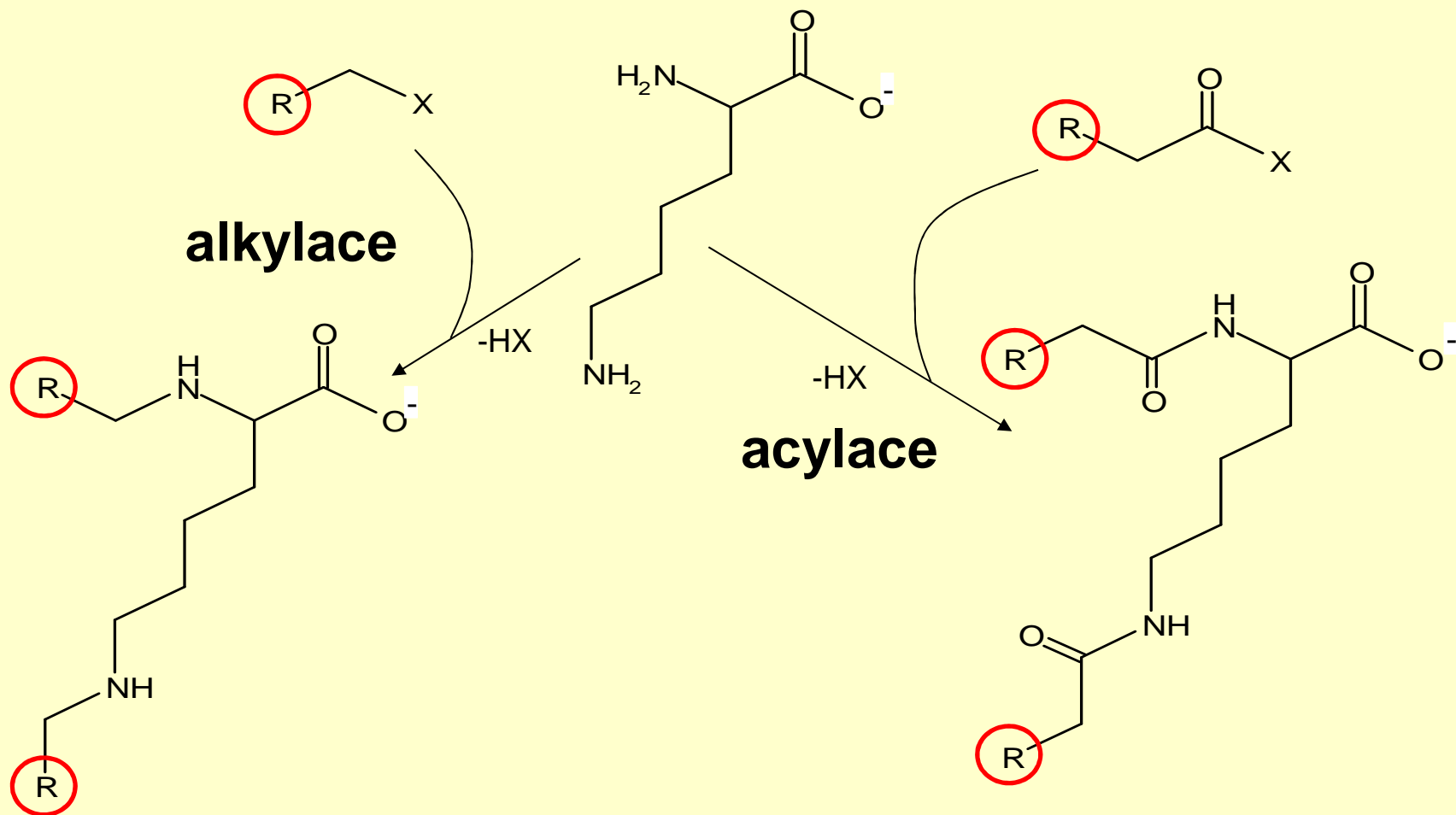
- modifikovat lze některé postranní řetězce AK, koncovou aminoskupinu a karboxyskupinu, a případně také kovalentně připojené prostetické skupiny (např. koenzymy)
- AK nepolární a hydrofobní: glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, **methionin** a prolin
- AK nepolární aromatické: fenylalanin a **tryptofan**
 - tyto jsou často orientovány dovnitř struktury proteinu, a tedy nepřístupné pro modifikační činidla

- **AK polární: asparagin, glutamin, threonin a serin**
 - mimo Gln často posttranslačně modifikovány oligosacharidovými zbytky přes N- nebo O- glykosidické vazby
 - často modifikovány enzymově (např. fosforylace), avšak chem. modifikace ve vodném prostředí nesnadná, protože nukleofilní vlastnosti hydroxyly i amidu se blíží vodě
- **AK s ionizovatelnou skupinou - kyseliny asparagová a glutamová, lyzin, arginin, cystein, histidin a tyrosin**
 - v deprotonovaném stavu jsou účinná nukleofilní činidla
 - hlavní cíl modifikačních reakcí

Aminoskupina (Lys, Arg, His, N-konec)

- volná aminoskupina (konec pept. řetězce a Lys) je nejčastějším cílem
- Lys (pK_a 9,3 až 9,5) je obvykle protonován
- Arg (pK_a přes 12) je protonován prakticky vždy
- His s imidazolovým kruhem (pK_a 6,7 až 7,1)
- aminoskupiny se účastní **alkylačních** a **acylačních** reakcí, kdy fungují jako nukleofily
- imidazol. kruh může být elektrofilní, např. při jodaci

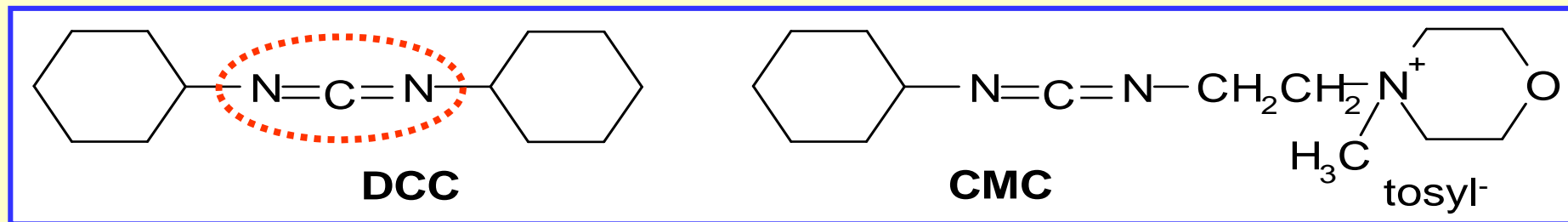
Alkylace a acylace aminoskupiny



- průběh při reakcích je nukleofilní substituce - vzniká tetraedrický intermediát, X je obecná odstupující skupina

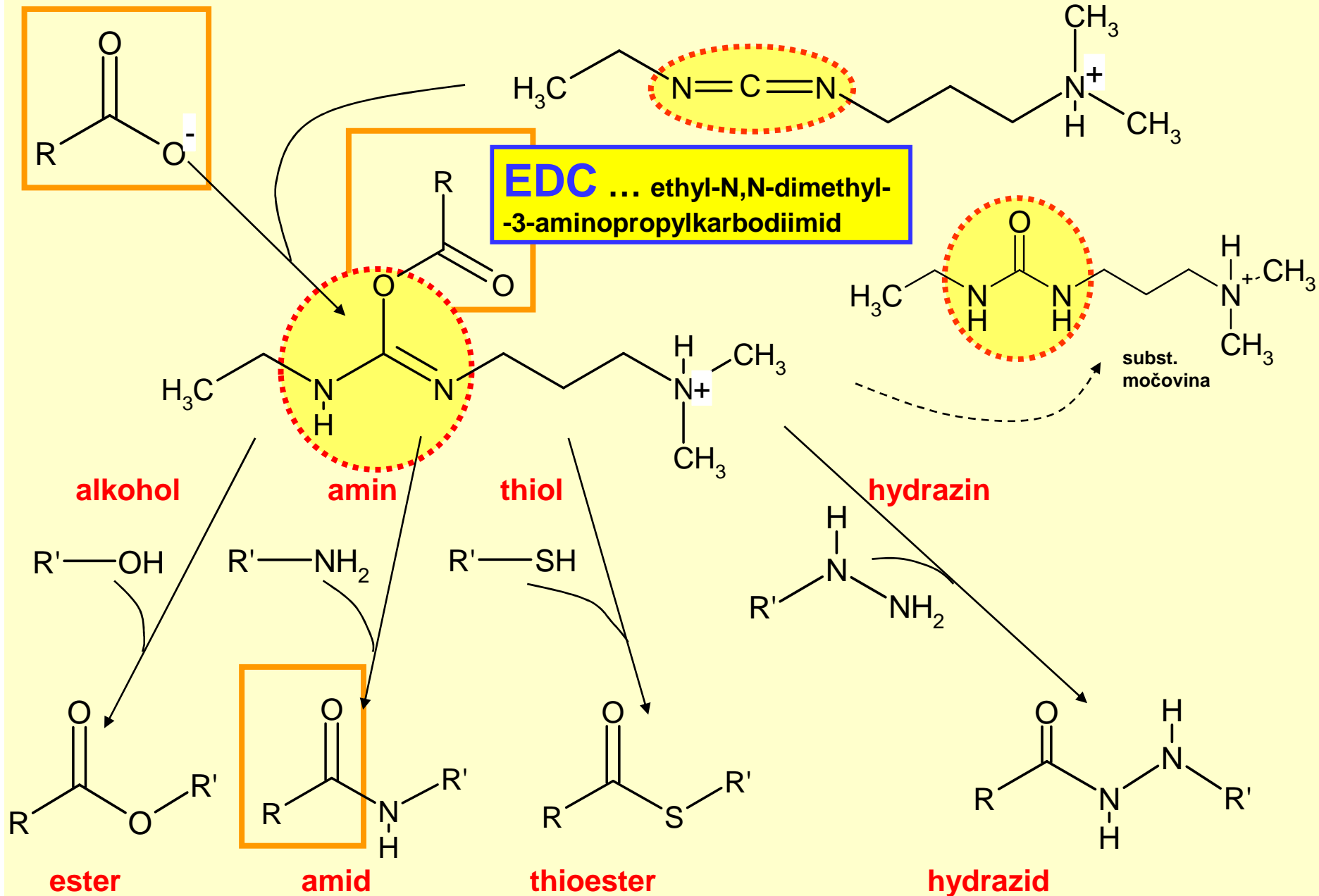
Karboxyskupina (Asp, Glu, C-konec)

- postranní karboxyly (pK_a 3,7 až 4,5) při fyziologickém pH nesou záporný náboj
- vhodné pro tvorbu **amidových**, případně i **hydrazidových** derivátů
- lze připravit i **thioestery** - ve vodném prostředí **nestabilní**
- derivatizace probíhá přes reaktivní intermediáty - nejznámější je použití **karbodiimidů** (EDC, DCC, CMC):



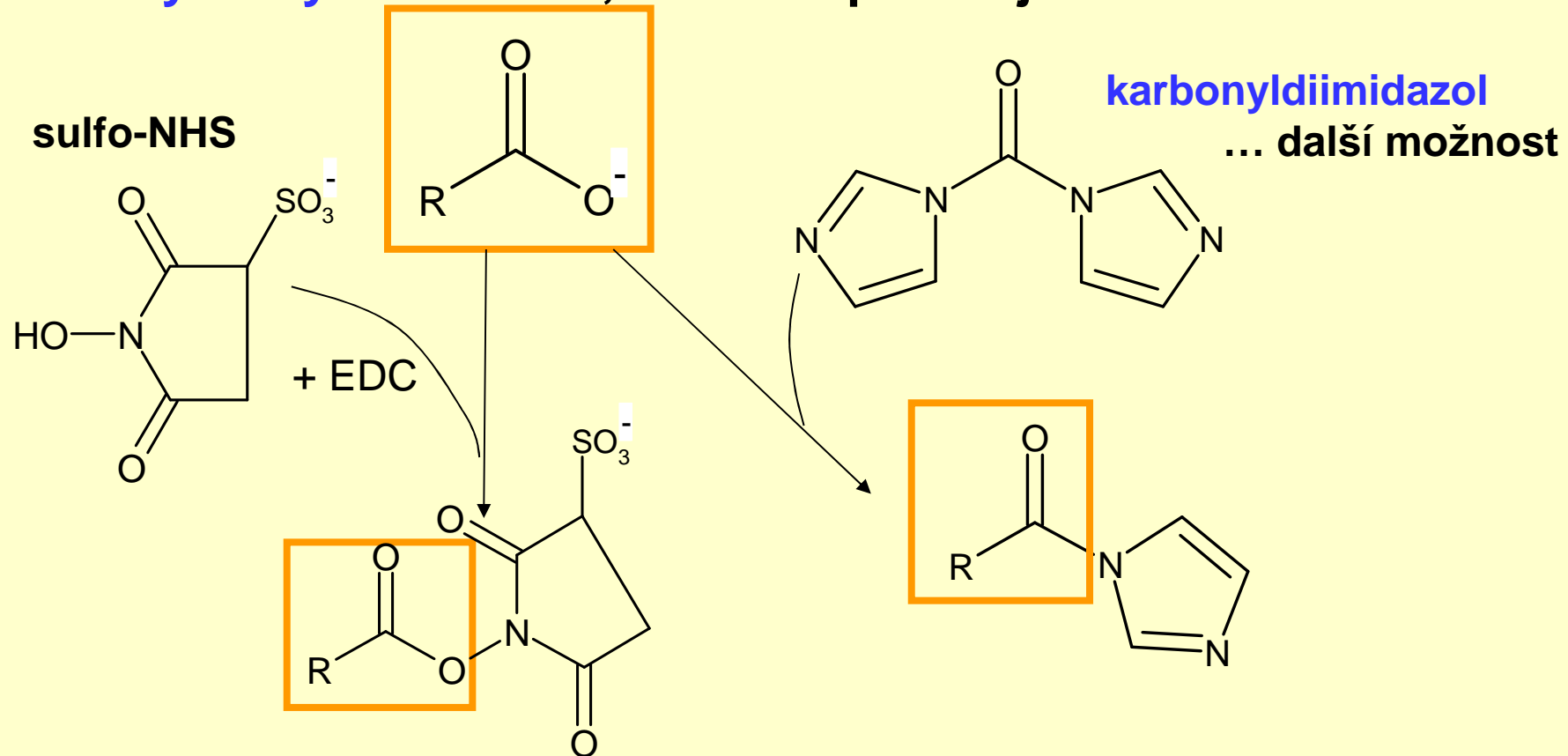
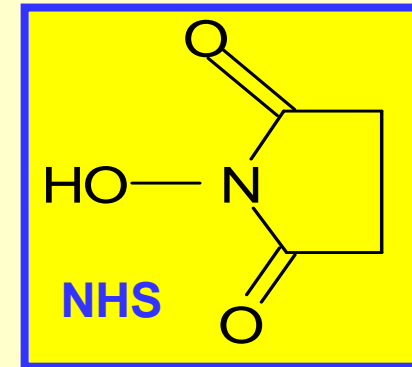
- **CMC** ... cyklohexylmorfolinoethylkarbodiimid
- **DCC** ... dicyklohexylkarbodiimid
 - nerozp. ve vodě, spíše pro konjugace malých molekul

Aktivace karboxylu karbodiimidem

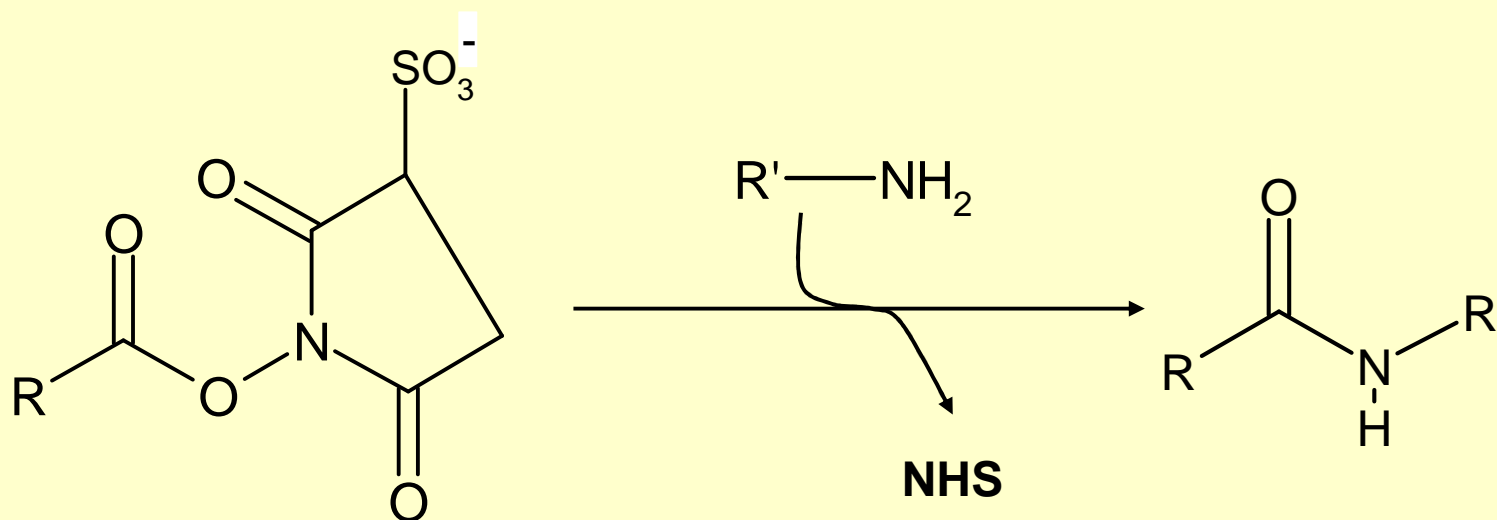


Alternativní postupy

- reakce s karbodiimidy je velmi rychlá
 - nesnadná kontrola průběhu, nežádoucí postranní reakce, konkurenční hydrolyza je rychlá
- konjugační reakce se provádí přes stabilnější aktivované meziprodukty - **NHS**, **N-hydroxysukcinimid**, nebo rozpustnější **sulfo-NHS**

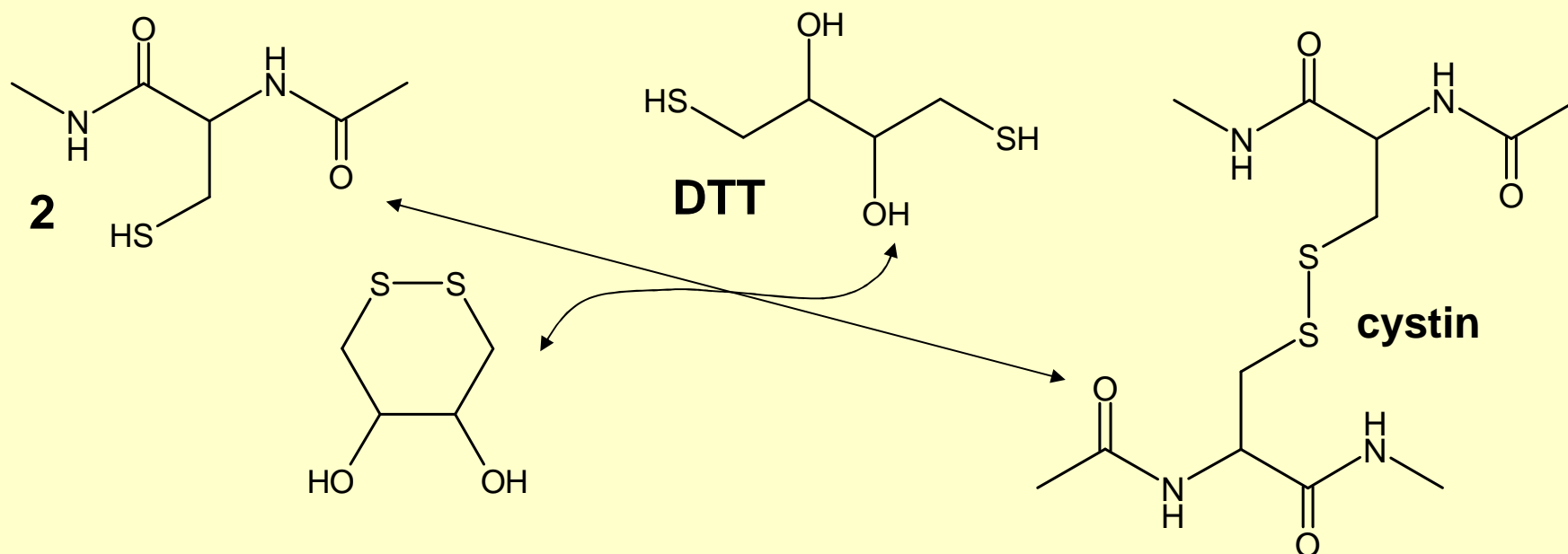


- vzniklé NHS-deriváty nebo imidazolylové deriváty jsou relativně stabilní ve vodném prostředí a ochotně reagují např. s aminoskupinou za vzniku amidů
- komerčně je dostupná široká škála NHS-aktivovaných molekul (NHS-biotin, NHS-fluorescein, ...), které se pak velmi jednoduše mohou konjugovat s cílovou biomolekulou ($R'-NH_2$):

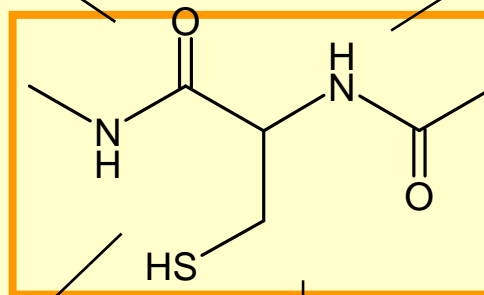
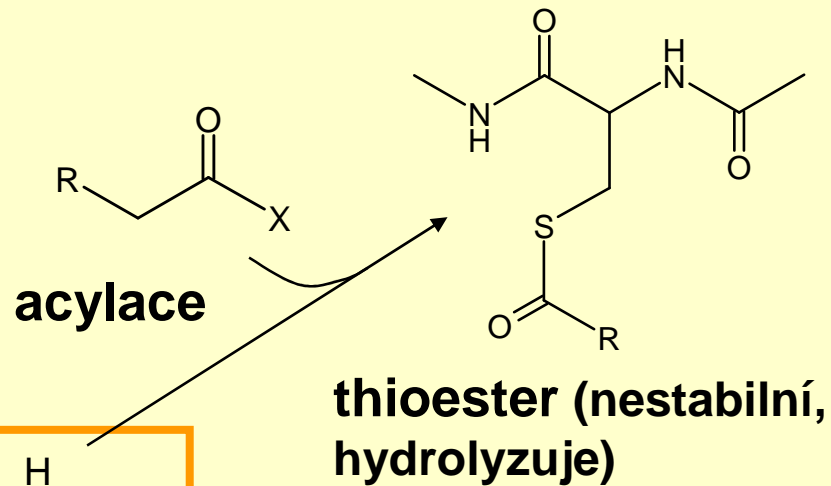
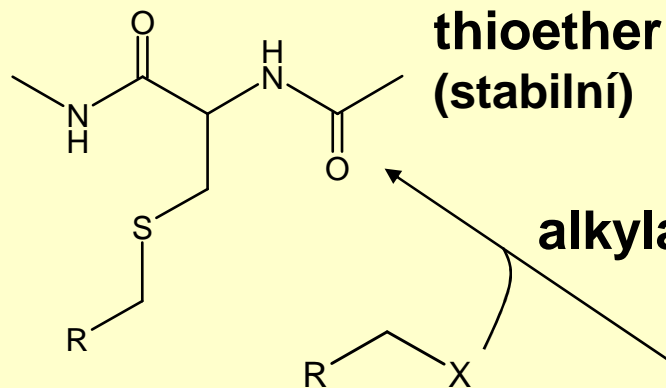


Thioskupina (Cys)

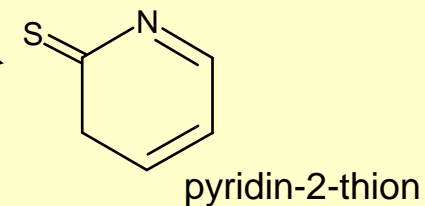
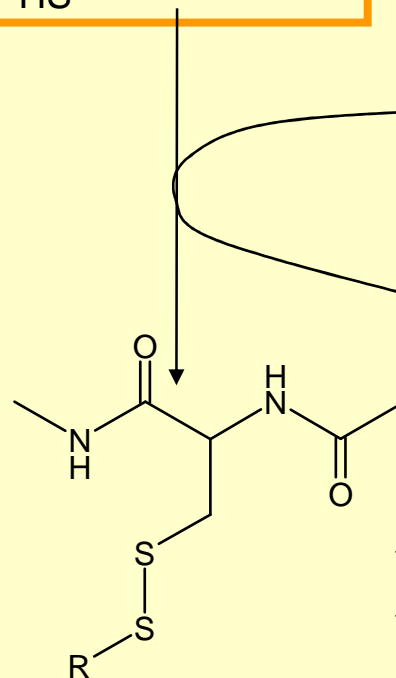
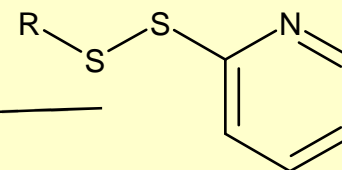
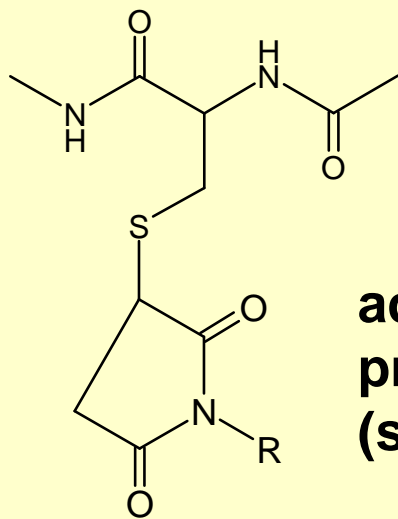
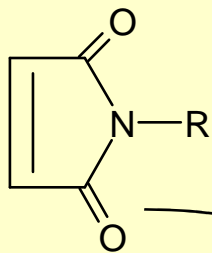
- cysteinové zbytky jsou normálně protonované a bez náboje (pK_a 8,8 až 9,1)
- nejdůležitější reakcí v přirozeném stavu je tvorba vzájemných disulfidů (cystinové uskupení)
- mohou se účastnit alkyací a reversibilních redoxních reakcí



- z oxidované formy (disulfid) vzniká redukovaná forma (volná SH skupina) pomocí redukčního činidla **dithiothreitolu (DTT, Cleandovo činidlo)**
- reakce může probíhat oběma směry

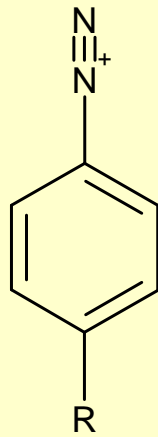


deriváty maleimidu (NEM)

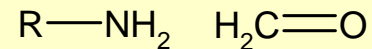
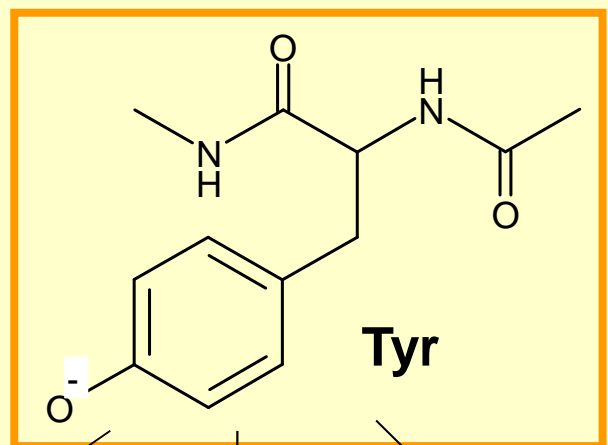


Fenolická skupina (Tyr)

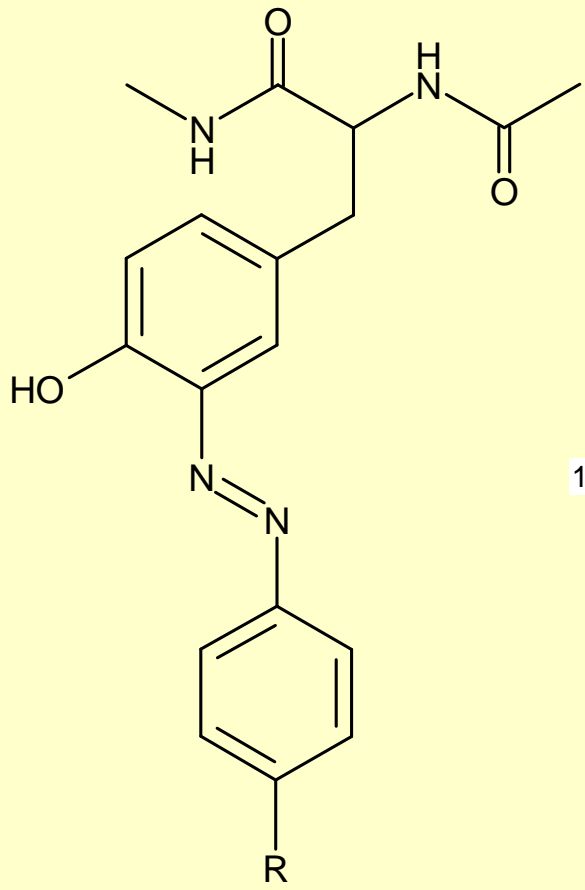
- **diazotační kopulace - elektrofilní substituce na aktivovaném benzenovém jádře**
 - probíhá do ortho polohy, spojení s aromatickými aminoskupinami, aktivací s kys. dusitou (dusitan a HCl) vzniká regující diazoniová sůl
 - vzniklé konjugáty mají oranžovou barvu
- **další možnost - jodace, radioaktivní značení ¹²⁵I**
- **Mannichova kondenzace - připojení aminosloučeniny v přítomnosti formaldehydu**



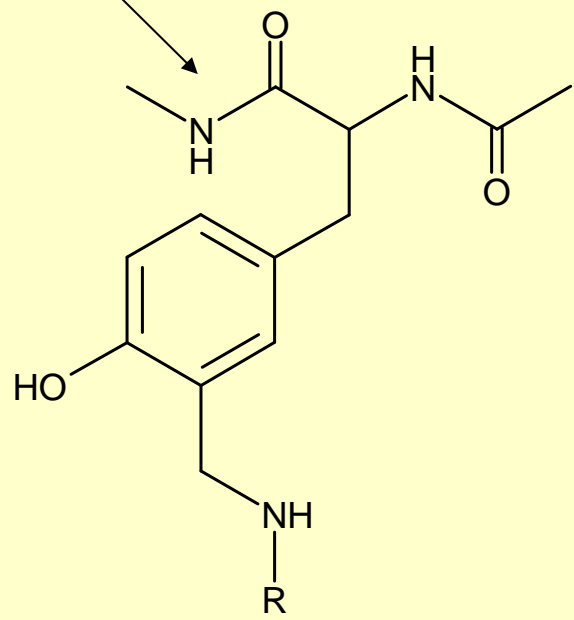
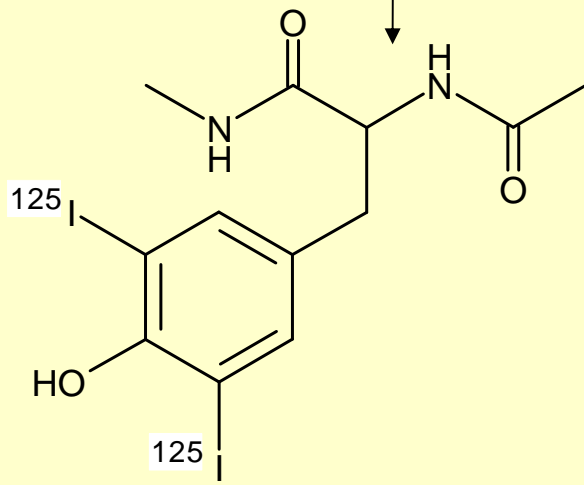
diazotace



Mannichova kondenzace

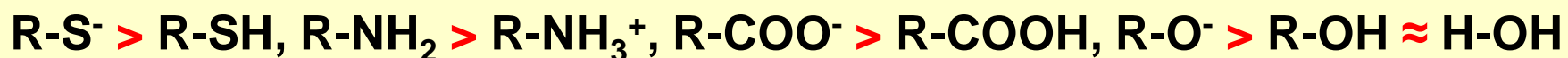


jodace



Specifita modifikačních reakcí

- účastní se bílkoviny, které obvykle poskytují řadu různých skupin - jejich srovnání dle síly nukleofilních vlastností:

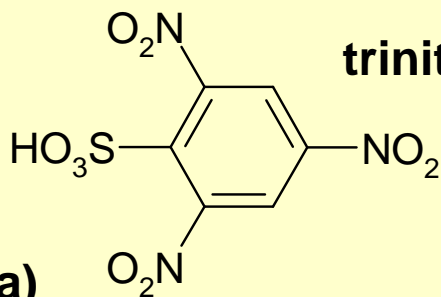


- úlohu hraje přítomnost náboje (protonovaná / deprotonovaná forma) - lze ovlivnit volbou pH, ale protože se hodnoty pK_a často překrývají, tak to není příliš spolehlivé
- pro přesné cílení modifikace na konkrétní skupiny je zapotřebí zvolit specificky reagující činidlo

Cílené zablokování postranních skupin

- **P-NH₂**
(Lys)

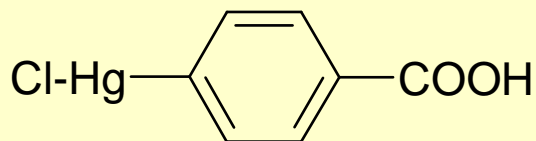
$R-N=C=S$
isothiocyanát
(adice - thiomočovina)



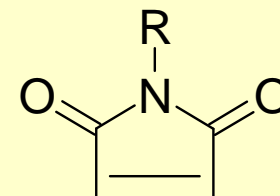
trinitrobenzensulfonová
kyselina (subst.)

aldehyd $R-CH=O$
(+ redukce borohydridem)

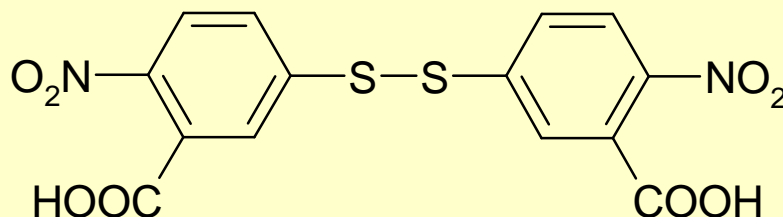
- **P-SH**
(Cys)



p-chlormerkuri
benzoová k.

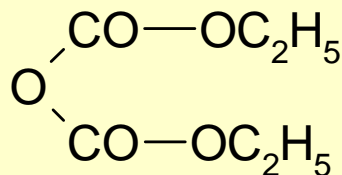


maleimidy, např. NEM
(adice)



5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoová k.)
DTNB, Ellmanovo činidlo
(substituce)

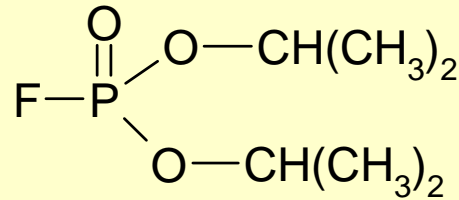
- **P--**
(His)



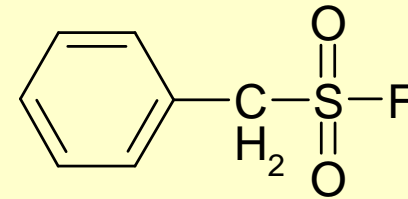
diethylpyrokarbonát (alkoxylace)

Cílená modifikace postranních skupin

■ P-OH (Ser)



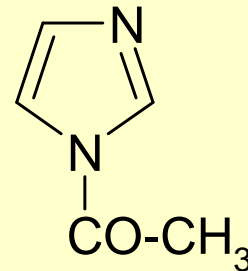
diisopropylfluorofosfát
DFP (fosforylace)



fenylmethylsulfonylfluorid
PMSF (sulfonylace)

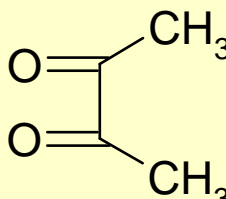
■ P---OH (Tyr)

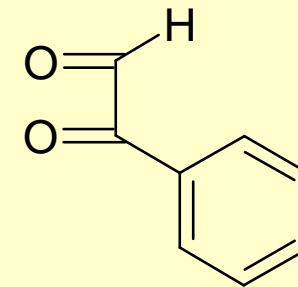
$C(NO_2)_4$
tetranitromethan
(nitrace)



N-acetylimidazol
NAI (acetylace)

■ P--NH-- (Arg)


2,3-butandion
(kondenzace)



fenylglyoxal (kondenzace)