



HIGHLIGHTS TECNOLOGIE INNOVATIVE

a cura di Pierfausto Seneci - Dipartimento di Chimica organica - Università di Milano

Se da una parte oggi la chimica ed altre discipline procedono verso la miniaturizzazione, e il prefisso nano- è sempre più (ab)usato in articoli e recensioni, dall'altra anche nello studio delle interazioni fra chimica, fisica e biologia il campo di battaglia si rimpicciolisce fino alla singola cellula, o a suoi compartimenti. In questo e in alcuni appuntamenti futuri riporterò alcuni recenti lavori al riguardo, iniziando da approcci che non modificano la natura e i processi cellulari, ma permettono di meglio evidenziarli e comprenderli.

Iniziamo dal *cell imaging* (altro termine molto inflazionato), cioè dal rendere più facilmente visibile uno o più componenti di una singola cellula. Fra i lavori più recenti, un gruppo cinese (B. Tang *et al.*, *JACS*, 2007, **129**, 11666) ha riportato un sensore molecolare fluorescente capace di evidenziare i gruppi SH in una cellula, dimostrandone la capacità di discriminare fra epatociti normali (alti livelli di proteine tiolate, forte fluorescenza) e cellule HepG2 (epatomi, bassi livelli di proteine tiolate, bassa fluorescenza); un gruppo californiano (S. Lord J. *et al.*, *JACS*, 2008, **130**, 9204) ha riportato dei fluorofori "push-pull", contenenti un gruppo azide fotoattivabile, capaci di penetrare la barriera citoplasmatica di cellule CHO e, dopo fotoattivazione, di legarsi a vari componenti cellulari; e un gruppo svizzero (M. Gautier *et al.*,

Chem. Biol., **15**, 128) ha riportato l'uso di due marcature ortogonali di due diverse specie proteiche in cellule CHO, permettendo l'osservazione dinamica di entrambe le specie.

Vorrei spendere qualche parola in più sul concetto dei "bioorthogonal chemical reporters", per la prima volta proposto dal gruppo di Carolyn Bertozzi a Berkeley. Con questo approccio in primo luogo si introduce una funzionalità chimica "non naturale", e stabile, su uno o più componenti della cellula, usando per introdurla reazioni metaboliche della cellula stessa e substrati non-naturali: fra i componenti marcati le proteine e in questo caso il vantaggio rispetto al classico "protein labeling" è nella minor perturbazione del target (le proteine marcatrici sono molto più ingombranti), ma anche glicani e lipidi. Una volta introdotto, questo *reporter group* viene poi attivato con una piccola molecola specifica, generando un segnale facilmente leggibile per fluorescenza, bioaffinità od altro, che permette di seguire (anche in maniera dinamica, e non solo statica!) il fato delle macromolecole marcate nella cellula o sulla sua superficie. Il reporter group più usato è l'azide: esso può essere introdotto in cellule viventi (ed anche in organismi pluricellulari!) tramite reazioni biocompatibili, quali la cicloaddizione con alcheni a dare dei triazoli, o la legazione di Staudinger, e le stesse reazioni in presenza di reagenti fotoattivabili su azidi agganciate alle cellule servono alla bisogna sopra citata.

Negli ultimi 12 mesi sono stati riportati almeno quattro esempi di questo approccio: per ognuno di essi l'azide è stata supportata, in maniere diverse, su glicani esposti sulla superficie cellulare. In due casi la reazione di attivazione è eseguita per cicloaddizione dell'azide su tripli legami contenuti in cicli tensionati, quali il cicloottino difluorinato **1** (J.M. Baskin *et al.*, *PNAS*, 2007, **104**, 16793) e il dibenzocicloottino **2** (X. Ning *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 2253) (Fig. 1); nel secondo caso il gruppo attivante consiste in una biotina (binding con streptavidina), mentre nel primo caso, oltre alla biotina, sono stati usati anche gruppi fluoroforici. Negli altri due casi, il gruppo di Bertozzi (P.V. Chang *et al.*, *JACS*, 2007, **129**, 8400; M.J. Hangauer, C.R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 2394) riporta l'uso di triarilfosfine a dare legazione di Staudinger con l'azide "bioorganica"; la struttura più interessante è il composto **3** (Fig. 1), che contiene anche nella funzione esterea (perduta dopo ligazione di Staudinger) un "quencher di fluorescenza" che permette di rilevare solo la fluorescenza post-ligazione e quindi di abolire ogni rumore di fondo.

Passiamo ora all'internalizzazione di strutture proteiche (Y.-J. Lee *et al.*, *JACS*, 2008, **130**, 2398) e polimeriche artificiali (S.L. Mangold *et al.*, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 2997); nel primo caso il passaggio di proteine attraverso membrane biologiche può essere monitorato spazialmente e temporalmente via loro marcatura con *probes* specifici,

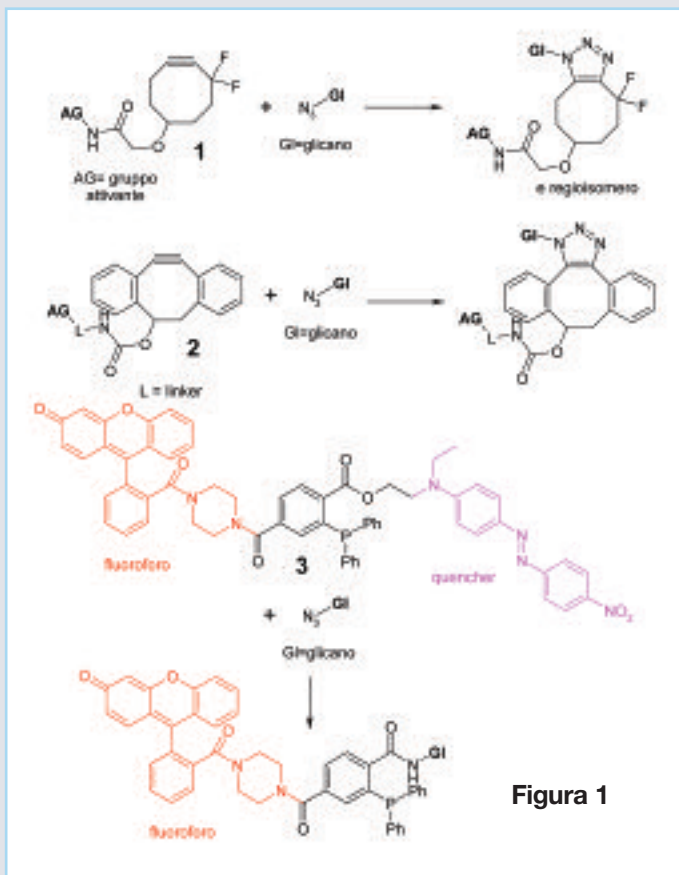


Figura 1

mentre nel secondo il polimero dinitrofenilico **4b** (Fig. 2) viene internalizzato attraverso riconoscimento da parte di uno specifico recettore di membrana (recettori B dinitrofenil-specifici) nella cellula, dove poi la sua struttura fluoroforica latente viene attivata per azione di esterasi e permette quindi di localizzare spazialmente e quantificare il processo di internalizzazione stessa.

Che ne dite di poter considerare il potenziale redox, e l'instaurarsi di fenomeni di ossidazione o di riduzione in una singola cellula? Mirkin, a New York (*PNAS*, 2008, **105**, 443), ha riportato l'uso di un sofisticato sistema che impiega dei nanosensori/nanoelettrodi per misurare non solo la capacità di un composto neutro o carico di penetrare la barriera cellulare, ma anche permette di "invadere" lo spazio cellulare senza compromettere la vitalità della cellula stessa, così da poter misurare variazioni di potenziali elettrochimici su nanoscala (!!!). Chang a Berkeley (*JACS*, 2007, **129**, 3548) ha riportato l'uso del sensore redox-sensibile **5a** (fluorescente a 490 nm) che, quando incubato in presenza di cellule come acetossimetilderivato bioreversibile e permeabile **5b**, viene rapidamente ridotto a dare il bisfenolo **6** non fluorescente (Fig. 3); sottoponendo le cellule a trattamento con acqua ossigenata, in 5-10 minuti la fluorescenza molto ridotta derivante dal trattamento con **5b** aumenta in maniera notevole (ossidazione di **6** a **5a**), per poi ritornare a livelli basali (smaltimento dello stimolo ossidativo) nei 10 minuti successivi; un secondo trattamento con acqua ossigenata provoca lo stesso fenomeno negli stessi tempi, confermando pertanto la validità del sistema anche per monitorare ripetuti stimoli, e la sua compatibilità con cellule che restano vive e vegete anche alla fine di una serie di esperimenti.

Per finire, due lavori a mio giudizio veramente intriganti. Nel primo (M.K. Kuimova *et al.*, *JACS*, 2008, **130**, 6672), la microviscosità di un intorno cellulare è misurata usando un "rotore molecolare" fluorescente (**7**, Fig. 3), la cui fluorescenza è legata a una conformazione metastabile in cui i tre anelli sono nello stesso piano; la capacità di ruotare intorno all'asse indicato in figura, e di disassare il sistema molecolare, provoca quindi un decadimento del segnale di fluorescenza che però decresce all'aumentare della viscosità del mezzo, che rallenta la rotazione del fenile. La fluorescenza di **7** permette quindi di valutarne l'internalizzazione e la localizzazione, mentre la velocità di decadimento del segnale in varie aree cellulari permette (essendo stata esclusa la possibilità di interazione di **7** con target intracellu-

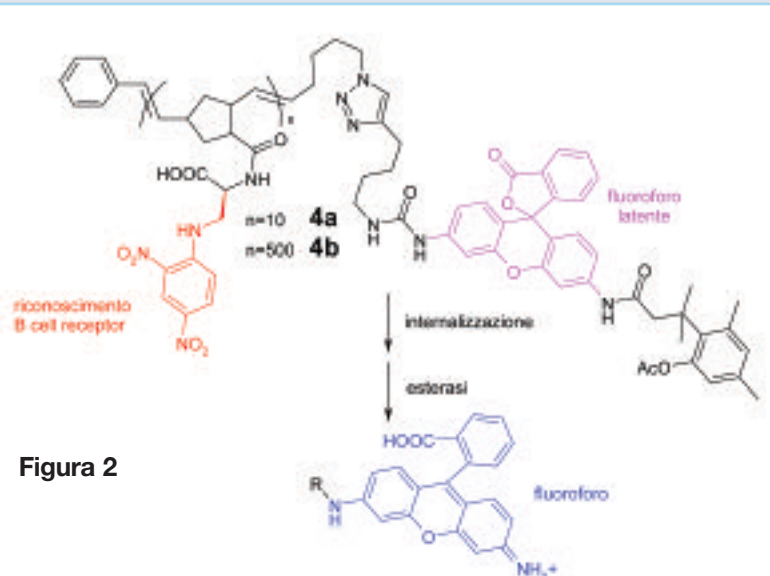


Figura 2

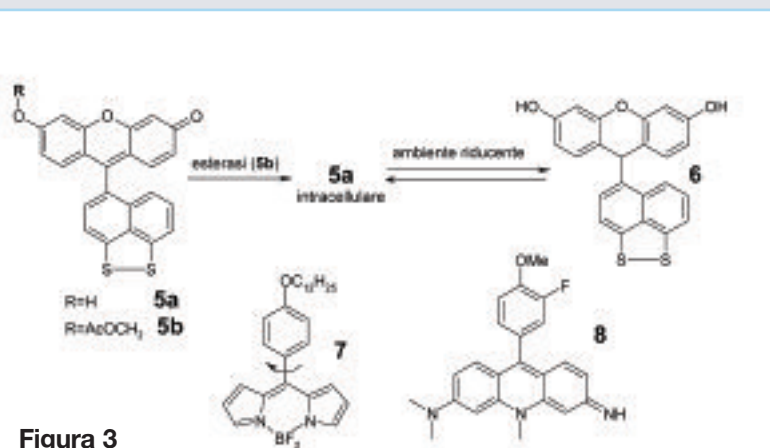


Figura 3

lari in maniera aspecifica, il che pure impedirebbe la libertà rotazionale che porta a decadimento di fluorescenza) di mappare con precisione la viscosità cellulare. Nel secondo lavoro (B.K. Wagner *et al.*, *JACS*, 2008, **130**, 4208) è stata riportata l'identificazione di piccoli sensori molecolari di fluorescenza quali **8** (Fig. 3) da una campagna di screening, in quanto capaci di discriminare fra lo stato differenziato e de-differenziato di una cellula (in questo caso, utilizzando mioblasti e miotubi); inutile dire, con la popolarità acquisita dalle cellule staminali e dalla loro capacità di differenziazione, come un metodo rapido per monitorare e quantificare un differenziamento (adatto a campagne di screening HTS) sia di grande interesse applicativo. Alla prossima puntata, dove l'osservazione e la comprensione saranno sostituiti dalla modifica più o meno razionale...