

Wieloanalitowe, małowzrostkowe sondy luminescencyjne do symultanicznego wykrywania kilku celów molekularnych w modelach komórkowych

mgr Anna Wychowaniec¹,

mgr Francesca Canyelles
i Font¹,

mgr Masroor A. Khan²,

dr Michał Gładysz³,

dr Dorota Kwiatek^{1,3},

dr hab. Jacek Ł. Kolanowski^{1,3}✉

¹Pracownia Testów i Obrazowania Molekularnego, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań
²Pracownia Chemii Medycznej, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań
³Centrum Biologii Chemicznej, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk, Poznań

https://doi.org/10.18388/pb.2021_538

✉ autor korespondujący: jkolanowski@ibch.poznan.pl

Słowa kluczowe: sondy luminescencyjne, sondy wieloanalitowe, sondy responsywne, próbki fluorescencyjne, maskowane substraty bioluminescencyjne, obrazowanie fluorescencyjne

Wykaz stosowanych skrótów: ESIPT – wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie protonu w stanie wzbudzonym (ang. *excited state intramolecular proton transfer*); FRET – rezonansowe przeniesienie energii fluorescencji (ang. *Förster resonance energy transfer, fluorescence resonance energy transfer*); ICT – wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku (ang. *intramolecular charge transfer*); PeT – fotoindukowane przeniesienie elektronu (ang. *photo-induced electron transfer*); POI – białko stanowiące przedmiot badań (ang. *protein of interest*); TICT – wewnątrzcząsteczkowy proces przeniesienia ładunku pod wpływem „skręcenia” oraz zmiany położenia grupy donorowej i akceptorowej względem siebie w przestrzeni (ang. *twisted intramolecular charge transfer*)

Podziękowania: Autorzy dziękują za wsparcie finansowe Narodowego Centrum Nauki (granty OPUS nr 2018/29/B/ST4/01498 oraz SONATA nr 2017/26/D/NZ1/01234), Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (grant HOMING nr POIR.04.04.00-00-441F/17-00). Autorzy dziękują również za finansowanie w

STRESZCZENIE

Luminescencja znalazła szerokie zastosowanie w biologii, biotechnologii i medycynie. W szczególności, sondy fluorescencyjne i bioluminescencyjne pozwalają na wizualizację celów molekularnych na poziomie komórkowym, a nawet makrocząsteczek czy pojedynczych analitów małowzrostkowych. Do najbardziej wiarygodnych narzędzi wizualizacji celów molekularnych należą tzw. sondy responsywne, które zmieniają intensywność oraz kolor emitowanego sygnału po interakcji z danym analitem (celem molekularnym). Przeważająca część sond responsywnych opisanych dotychczas w literaturze pozwala na wiarygodną detekcję pojedynczego analitu. Tymczasem większość procesów zachodzących w organizmie ludzkim zachodzi z udziałem wielu elementów jednocześnie. By lepiej zrozumieć i badać te mechanizmy, istnieje możliwość wykorzystania kilku responsywnych sond jednocześnie lub tzw. sond wieloresponsywnych i wieloanalitowych (ang. *multi-responsive and multi-analyte*). Zastosowanie tych ostatnich zwiększa wiarygodność uzyskanych wyników i ułatwia ich interpretację. W ramach artykułu zostaną omówione przykłady sond wieloanalitowych podzielone ze względu na ich mechanizm odpowiedzi i wykrywane zmiany wewnątrz komórki.

WPROWADZENIE

Komórka jest dość powszechnie i błędnie traktowana jako złożony roztwór, podczas gdy w rzeczywistości przypomina bardziej zatłoczony, lepki żel składający się z niezliczonych indywiduów (makrocząsteczek, małych cząsteczek, jonów, reaktywnych form tlenu lub azotu itp.), oddzielonych licznymi błonami komórkowymi. Kompartamentacja komórki zapewnia unikalną możliwość zachodzenia przeciwstawnych procesów w tym samym czasie. Każda z cząsteczek jest dynamicznie otoczona przez inne indywidua, a w składzie i stężeniu różnych związków występują lokalne fluktuacje w zależności od miejsca w komórce i etapu procesu, w którym uczestniczą. Mimo subtelnych, aczkolwiek ważnych różnic znaczeniowych, te dynamiczne zmiany nazywane są w literaturze naukowej często zamiennie: zmianami w mikrośrodkowisku i nanośrodkowisku lub nanozmianami w mikrośrodkowisku. Mogą one obejmować stłoczenie cząsteczek, fluktuacje lepkości lub polarności, lokalne zmiany pH, itp. Monitorowanie tych zmian, przy jednoczesnej obserwacji i pomiarze właściwości fizykochemicznych jest niezbędne do zrozumienia prawdziwej molekularnej natury procesów fizjologicznych i patologicznych [1]. Parametry te odzwierciedlają często przejściową i dynamiczną homeostazę na poziomie komórkowym, a nawet subtelne wahania parametrów mogą być postrzegane jako potencjalnie początkowe stadia choroby. Wiadomo na przykład, że polarność i lepkość mikrośrodkowiska, przez wpływ na szybkość dyfuzji cząstek sygnałowych oraz wpływ na stabilność i rodzaj oddziaływań międzycząsteczkowych, odgrywają rolę w regulowaniu inicjacji i rozwoju różnych stanów patologicznych, takich jak zapalenie, supresja immunologiczna i rak [2].

Przeważająca część badań nad zrozumieniem wpływu mikrośrodkowiska na strukturę i funkcję biologicznych celów molekularnych ogranicza się do badań „w buforze”. Podobnie jest z szeregiem małowzrostkowych sond fluorescencyjnych do pomiaru parametrów mikrośrodkowiska, z których większość nie została jak dotąd z sukcesem wykorzystana w komórkach. Pomimo dostępności szerokiej gamy buforów, imitujących fizjologiczne środowisko wewnątrzkomórkowe, przełożenie wyników z badań odpowiedzi i działania sond fluorescencyjnych „w buforze” na zachowanie wewnątrzkomórkowe jest mało wiarygodne [3]. Przykładowo, wprowadzenie małych cząsteczek do komórek może

ramach projektu „NEBI – Krajowy Ośrodek Badań Obrazowych w Naukach Biologicznych i Biomedycznych” z Polskiej Mapy Drogowej Infrastruktury Badawczej (grant nr POIR.04.02.00-00-C004/19-00) oraz za finansowanie z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla projektu „POL-OPENSREEN – Polska Platforma Infrastruktury Skriningowej dla Chemii Biologicznej” (nr decyzji: DIR/WK/2018/06).

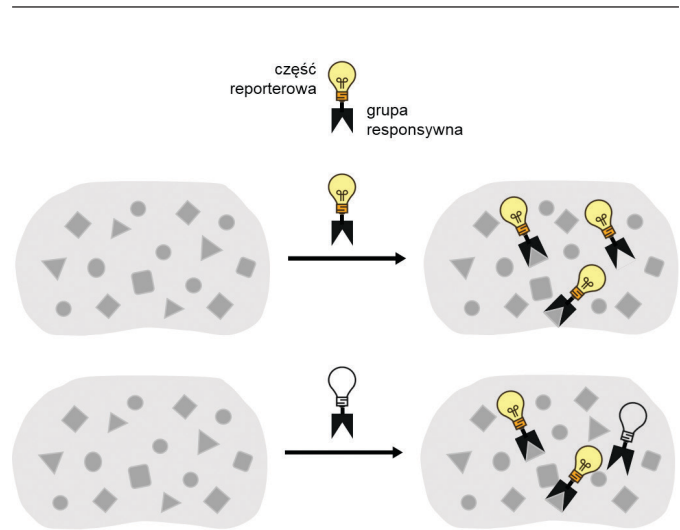
powodować stan wewnętrznego stresu, wpływając na cel molekularny danej sondy, a nawet działanie samej sondy. W związku z tymi potencjalnymi reakcjami ubocznymi, wyniki eksperymentów z wykorzystaniem linii komórkowych mogą być zbyt trudne do interpretacji przez użytkowników sond. Tym samym, niezwykle istotny jest rozwój cząsteczek, które można wykorzystać bezpośrednio w komórkach, a ich odpowiedź fluorescencyjna pozwalałaby jednoznacznie (a) ocenić w jakim środowisku się znalazła i (b) czy oddziaływała z analitem docelowym.

Wewnątrzkomórkowe procesy biologiczne angażują wiele komponentów w różnych częściach komórki i są często trudne do bezpośredniej obserwacji bez zastosowania kombinacji technik spektroskopowych i mikroskopowych. Wśród wielu metod obrazowania komórek, luminescencyjne sondy molekularne dają wyjątkowe możliwości dokładniejszego śledzenia tych procesów, zwiększając naszą wiedzę o molekularnych podstawach działania komórki. Spośród szeregu opracowanych sond luminescencyjnych, w tym nanocząstek, polimerów i genetycznie zakodowanych znaczników, małe cząsteczki organiczne są szczególnie atrakcyjne ze względu na ich szeroką paletę spektralną oraz relatywną łatwość modyfikacji. Szeroko zakrojone wysiłki podjęte w ostatnich dziesięcioleciach doprowadziły do coraz większej popularyzacji funkcjonalizowanych sond do selektywnej wizualizacji celów molekularnych i parametrów fizycznych w mikrośrodkach komórkowych [4, 5].













Jedną z najbardziej rozpowszechnionych technik detekcji sygnału w komórce w badaniach podstawowych i aplikacyjnych jest mikroskopia fluorescencyjna. Głównymi jej zaletami są: ogromna różnorodność i zróżnicowane zaawansowanie instrumentów/mikroskopów czy wysoka rozdzielczość czasowa i przestrzenna (nawet do poziomu pojedynczych cząsteczek). Dodatkowo, ten rodzaj mikroskopii zapewnia możliwość obserwacji wielu kolorów jednocześnie (tzw. *multiplexing*) oraz ma relatywnie nieinwazyjny charakter umożliwiający badania przyżyciowe. W tym kontekście, sondy fluorescencyjne pełnią kluczową rolę jako narzędzia wytwarzające wykrywalny sygnał zależny od otoczenia fizykochemicznego, pozwalając na wizualizację inaczej „niewidzialnych” (bo nie wytwarzających sygnału) celów i parametrów. Umożliwiają także określenie ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej, a nawet do pewnego stopnia kwantyfikacji ich stężeń. Te informacje są kluczowe dla określenia roli biologicznej i udziału tych endogennych elementów w procesach fizjologicznych i patologicznych oraz otwierają drogę do ich zrozumienia i modyfikacji (np. poprzez projektowanie skuteczniejszych leków). W przeciwieństwie do tzw. znaczników, czyli cząsteczek, które zawsze niezmiennie emitują taki sam sygnał, fluorescencyjne sondy responsywne zwykle pozwalają na bardziej wiarygodną i łatwiejszą do zinterpretowania detekcję. Jest to związane z tym, że emitowany przez nie sygnał zmienia się w efekcie oddziaływań z celem molekularnym lub w konsekwencji zmiany właściwości fizycznych środowiska (Ryc. 1).

Złożoność procesów biologicznych wynika z jednoczesnego udziału w nich szeregu związków chemicznych, zlokalizowanych w odpowiednim miejscu i w odpowiednim

czasie. Większość powszechnie stosowanych sond fluorescencyjnych pozwala na obrazowanie pojedynczego analitu lub ich zastosowanie ograniczone jest do zastosowań „w buforze” (pozakomórkowych). Tzw. sondy wieloanalitowe pozwalają bardziej wiarygodnie wykrywać i monitorować relacje między wieloma elementami w danym układzie biologicznym (tj. związkami chemicznymi, lepkością, polarnością itp.), niż układ wielu sond monoanalitowych (Ryc. 2) [6]. Dzieje się tak dzięki temu, że w przeciwieństwie do wykorzystania dwóch niezależnych sond nakierowanych na pojedyncze anality, jedna sonda do detekcji kilku analitów eliminuje artefakty związane m.in. z różnicą w lokalizacji oraz metabolizmie różnych sond, ułatwiając interpretację wyników oraz pozwalając na bardziej wiarygodne skorelowanie sygnału z rzeczywistą obecnością obu analitów w swoim sąsiedztwie. Niemniej jednak, poza uniwersalnymi optymalnymi parametrami sond responsywnych, do wiarygodnej detekcji analitów w modelach biologicznych, takimi jak selektywność, fotostabilność, jasność i biokompatybilność, projektowanie i wykorzystanie sond wieloanalitowych wymaga uwzględnienia szeregu dodatkowych aspektów. Przede wszystkim, w celu wiarygodnego wykrywania wielu analitów jednocześnie, sonda wieloanalitowa musi generować unikatowy sygnał w obecności obu analitów (A oraz B), różny dla sygnałów generowanych w przypadku każdej innej kombinacji (np. tylko A, tylko B lub brak obu – Ryc. 2) [7,8]. Częstą analogią w projektowaniu tego typu narzędzi jest struktura bramki logicznej, dla której obecność analitu stanowi sygnał wejściowy, a fluorescencja – sygnał wyjściowy. Przy takim założeniu, układem, który spełnia kryterium unikatowego sygnału w obecności obu analitów jest bramka typu AND (iloczynu logicznego). Innym często rozważanym układem są sondy, które generowałyby rozróżnialny sygnał dla każdej z możliwych kombinacji (Ryc. 2, (iii)). Niemniej należy zaznaczyć, że taka odpowiedź nie jest warunkiem koniecznym do zachowania wiarygodności odczytu jednoczesnej obecności obu analitów.



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie różnicy między mechanizmem działania a) „znacznika” oraz b) „sondy responsywnej”. Jasnoszare elementy symbolizuje komórki, ciemnoszare elementy (kwadraty, koła, trójkąty) zaś potencjalne cele molekularne wewnątrz komórki. Żółta żarówka oznacza aktywną emisję luminescencji sondy, a przezroczysta żarówka brak emisji.

	i	ii	iii
Brak analitu			
Analit A			
Analit B			
Analizy A + B			

Rycina 2. Schemat przedstawiający tabelę bramek logicznych, opisującą różne rodzaje odpowiedzi możliwych do uzyskania od wybranej sondy wieloanalitowej; tutaj na przykładzie sondy dwuanalitetowej. Kolory żarówek (żółty, czerwony, niebieski) oznaczają przykładowe (różne od siebie) kolory emisji sondy w odpowiedzi na analit A, analit B lub oba analizy A+B. Biały kolor żarówki oznacza brak emisji (zaadaptowano z [6]).

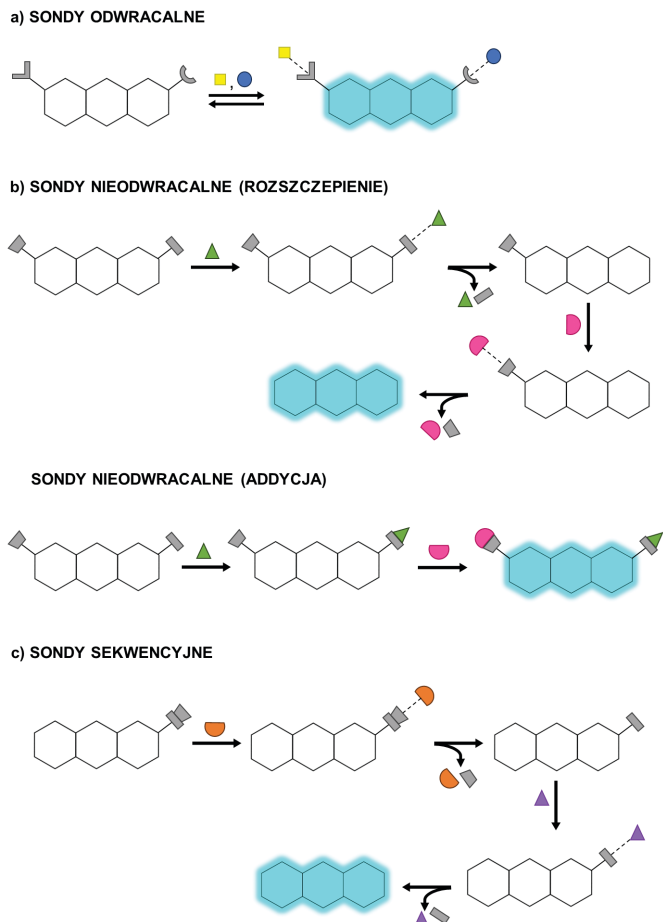
Mimo przewagi sond np. dwuanalitetowych nad sondami monoanalitetowymi w wykrywaniu relacji między dwoma analitami jednocześnie, ich projektowanie i walidacja w praktyce stanowią nie lada wyzwanie. Większość sond jednoanalitetowych zbudowana jest w oparciu o zmianę intensywności sygnału (wzrost – tzw. sondy „on” lub spadek – tzw. sondy „off”) przy jednej określonej długości fali. Tego typu odpowiedź pociąga za sobą szereg ograniczeń wynikających przede wszystkim z braku możliwości rozróżnienia czy wzrost/spadek sygnału wynika ze spadku/wzrostu stężenia sondy (bez udziału analitu) czy też w wyniku aktywacji/dezaktywacji sondy analitem. W przypadku sond dwuanalitetowych, dla których zarówno analit A, jak i B wpływają na intensywność tego samego sygnału, dodatkowym parametrem jeszcze bardziej utrudniającym interpretację odczytu jest relatywny stosunek obu analitów do siebie (tzn. kilka różnych kombinacji stężeń analitów będzie dawało ten sam wzrost/spadek intensywności). W związku z tym, w praktyce jedynymi rodzajami sond, które pozwalają na wiarygodną korelację sygnału ze współobecnością obu analitów są sondy, które emitują sygnał tylko, gdy oba analizy są obecne (Ryc. 2, (i) – sondy specyficzne) lub sygnał innego koloru w przypadku obecności obu analitów, w porównaniu do pojedynczych analitów (Ryc. 2, (ii) i (iii) – sondy selektywne). Niemniej, aby móc wiarygodnie wykorzystywać sondy dwuanalitetowe w układach biologicznych, kluczowa jest wnikliwa i wielopoziomowa charakterystyka ich odpowiedzi na różne kombinacje wykrywanych analitów, jak i innych indywidualów mogących wpływać na ich działanie.

Mechanizmy działania sond responsywnych zostaną szczegółowo omówione w kolejnych rozdziałach niniejszego artykułu. Podczas omawiania kolejnych grup sond luminescencyjnych jako analit będziemy rozumieć zarówno pojedyncze indywidualum (makrocząsteczki, małe cząsteczki, jony, reaktywne formy tlenu i azotu itp.), jak i zmianę parametrów środowiska biologicznego wewnątrz komórki (np. zmiana lepkości czy polarności). Tym samym, przykładowo sonda wrażliwa na obecność enzymu oraz zmiany w polarności mikrośrodowiska będzie zwana „dwuanalitetową”, podobnie jak sonda wrażliwa na obecność dwóch typowych analitów.

W niniejszej pracy przeglądowej koncentrujemy się zatem na (1) wieloanalitetowych sondach luminescencyjnych o (2) udokumentowanym zastosowaniu komórkowym i (3) mających mniej niż 1000 Da (czyli tzw. sond małowcząsteczkowych/niskocząsteczkowych). Obecne opracowanie ma na celu przybliżyć polskojęzycznym czytelnikom koncepcję, zalety i dotychczasowe osiągnięcia w obszarze sond wieloanalitetowych do zastosowań w biologii jako unikatowych narzędzi do wiarygodnego badania procesów fizjologicznych i patologicznych w komórkach. Będziemy opierać się na wyselekcjonowanych przykładach z uwzględnieniem kilku najnowszych sond. Więcej szczegółowych informacji i przykładów tych narzędzi można znaleźć w szeregu angielskich prac przeglądowych powstałych w ostatnich latach. W szczególności, w 2018 roku opublikowaliśmy pracę przeglądową podsumowującą dotychczasowe osiągnięcia i formułującą kryteria rozwoju sond wieloanalitetowych z praktycznym potwierdzonym zastosowaniem w biologii [6]. Od tego czasu pojawił się szereg szczegółowych i zaktualizowanych opracowań obejmujących różne kategorie tych narzędzi [1, 9, 10]. W literaturze można także znaleźć prace skupiające się na wybranej lokalizacji wewnątrz komórki, np. do zastosowań w mitochondriach [11], a nawet przybliżające narzędzia selektywne wobec kwasów nukleinowych wraz z innym wybranym indywidualum biochemicznym [12] czy sondy zdolne do jednoczesnego wykrywania kilku anionów [13].

KLASY SOND WIELOANALITOWYCH

Sondy wieloanalitetowe składają się z kilku kluczowych elementów: jednego lub więcej fragmentów sygnałowych (np. fluoroforów) i co najmniej dwóch motywów detekcyjnych, z których każdy oddziałuje specyficznie z jednym z docelowych analitów. W niniejszej pracy zdecydowaliśmy się sklasyfikować sondy, które zostały do tej pory opublikowane, w oparciu o sposób oddziaływania z analitem: odwracalna (poprzez tworzenie przejściowego kompleksu, którego istnienie zależy od stężenia/mikrośrodowiska lub w wyniku odwracalnej reakcji, np. redoks) lub nieodwracalna reakcja (poprzez rozszczepienie lub praktycznie nieodwracalną addycję). Odwracalna interakcja umożliwia dynamiczne zmiany procesów zachodzących w komórkach. Co więcej, takie sondy mogą oddziaływać z wybranym analitem wiele razy, a po interakcji powracają do swojej pierwotnej postaci. Sondy odwracalne są głównie wykorzystywane do wykrywania obecności kationów, anionów lub zmian pH (Ryc. 3a). Podobny charakter oddziaływania występuje



Rycina 3. Schemat przedstawiający trzy różne typy dwuanalitowych sond: a) sondy odwracalne; b) sondy nieodwracalne (kolejno przez rozszczepienie i addycję); c) sondy sekwencyjne. Trzy połączone ze sobą sześciiany koloru białego przedstawiają cząsteczkę w formie nie emitującej fluorescencji, a z niebieskim tłem wykazujące emisję (część reporterowa). Szare kształty dołączone po bokach to grupy responsywne. Kolorowe kształty symbolizują cele molekularne rozpoznawane przez kolejne sondy.

je w przypadku sond wrażliwych na zmiany parametrów środowiska, jak lepkość czy polarność. Nieodwracalne sondy z kolei, zostają trwale zmienione po reakcji z analitytem, a zatem nie mogą go ponownie wykryć; zwykle mają specjalną selektywną grupę reaktywną, wrażliwą tylko na wybrany analityt będący przedmiotem zainteresowania (np. selektywny wobec reaktywnych form tlenu lub białka będącego przedmiotem zainteresowania) (Ryc. 3b). Oprócz tych dwóch podstawowych typów sond, istnieje kolejny typ,

tw. sondy mieszanej, wykorzystującej oba typy konstrukcji jednocześnie. Jedną część cząsteczki oddziałuje wówczas z analitytem w sposób odwracalny, podczas gdy druga reaguje jednorazowo i np. ulega podstawieniu, co skutkuje zmianą struktury, a tym samym właściwości sondy. Inną kombinacją odpowiedzi są tzw. sondy sekwencyjne. Te ostatnie wykrywają dwa analityty, ale drugi może być wykryty tylko wtedy, gdy pierwszy analityt wejdzie w interakcję z sondą. (Ryc. 3c).

Dalsza część artykułu podzielona została na pięć części, w których omówione sondy wieloanalitowe zostały podzielone na grupy ze względu na rodzaj wykrywanych celów molekularnych i parametrów fizykochemicznych środowiska. W szczególności, artykuł obejmuje sondy luminescencyjne (narzędzia molekularne) do detekcji (1) lepkości i analitytów, (2) polarności i analitytów, (3) mikrośrodowiska białek, (4) dwóch lub więcej celów molekularnych oraz (5) dwuanalitowe sondy bioluminescencyjne (Tabela 1).

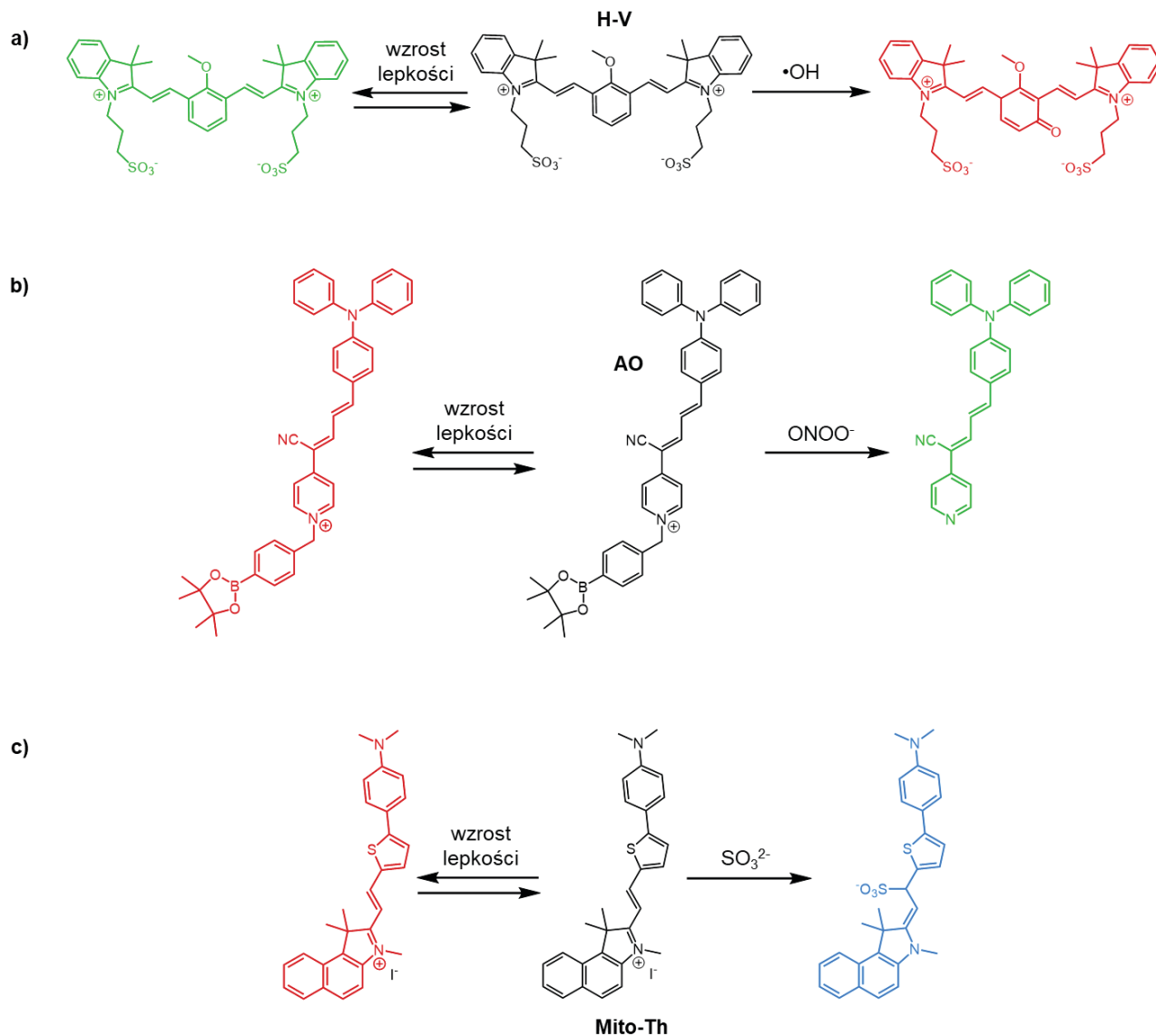
WIELOANALITOWE SONDY WRAŻLIWE NA ZMIANY LEPKOŚCI

Lepkość stanowi kluczowy czynnik fizyczny wpływający na dyfuzję w procesach biologicznych. Lepkość wewnątrzkomórkowa wykazuje znaczną niejednorodność, co stanowi wyzwanie w uzyskaniu kompleksowej mapy lepkości komórkowej z wyszczególnionymi informacjami na temat organelli [14]. Naukowcy sugerują, że parametr lepkości może zmieniać się nie tylko pomiędzy różnymi typami komórek, ale także w obrębie tej samej populacji komórek [15].

Jedną z metod, która może być wykorzystana do badania lokalnych zmian lepkości, jest zastosowanie tzw. fluorogenicznych niskocząsteczkowych sond wrażliwych na lepkość. Sondy fluorogeniczne stają się fluorescencyjne dopiero po interakcji z wybranym celem molekularnym. Mechanizm ich działania opiera się na odwracalnej lub nieodwracalnej interakcji, w zależności od natury samej sondy. Część wykrywająca zmiany lepkości opiera się zwykle na jednym z mechanizmów: (1) wewnątrzcząsteczkowym przeniesieniu protonu w stanach wzbudzonych 3-hydroksychromonów; (2) przeniesieniu ładunku obserwowanym w barwnikach typu push-pull opartych na czerwieni niłowej, fluorenie, pireninie i podobnych związkach [proces przeniesienia ładunku pod wpływem „skręcenia” i zmiany położenia grupy donorowej i akceptorowej względem siebie w przestrzeni, tzw. TICT (ang. *twisted intramolecular charge transfer*)]; (3) nieradiacyjnych procesach dezaktywacji w ro-

Tabela 1. Podsumowanie typów wieloanalitowych sond responsywnych przedstawionych w niniejszej pracy przeglądowej.

	Typ sygnału	Rodzaj analitytów	Typ interakcji
Rozdział 1	Fluorescencja	Lepkość i analityt molekularny	Mieszana
Rozdział 2	Fluorescencja	Polarność i analityt molekularny	Mieszana
Rozdział 3	Fluorescencja	Lepkość/polarność i jon metalu w otoczeniu białka	Mieszana
Rozdział 4	Fluorescencja	Analityt molekularny 1 i analityt molekularny 2	Mieszana
Rozdział 5	Bioluminescencja	Analityt molekularny 1 i analityt molekularny 2	Nieodwracalna



Rycina 4. Struktury sond i mechanizmy wykrywania analityków: a) zmian lepkości i obecności $\cdot\text{OH}$ H-V [22]; b) zmian lepkości i obecności ONOO^- AO [23]; c) zmian lepkości i obecności SO_3^{2-} Mito-Th [24]. Kolory cząsteczek (czerwony, niebieski, zielony) oznaczają odpowiednio kolor emisji cząsteczki w odpowiedzi na wybrany analityk, podczas gdy czarny kolor oznacza cząsteczkę nieaktywną (brak emisji lub bardzo słaba emisja).

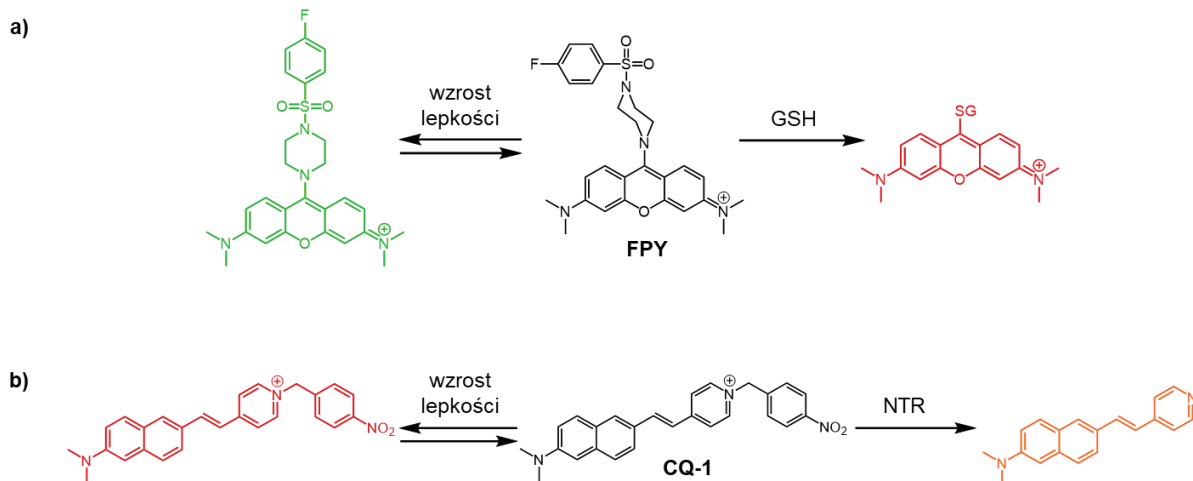
torach molekularnych; (4) tworzeniu H-agregatów w dimerach barwników [16,17].

Sondy wrażliwe na lepkość znalazły liczne zastosowania w obserwacji procesów zachodzących wewnątrz żywych komórek. Okazały się one wyjątkowo przydatne w badaniu błon komórkowych [18], ze szczególnym uwzględnieniem np. stresu oksydacyjnego i jego związku z badaniem neuroprotekcji [19] lub badaniem związku między lepkością mitochondriów w tkankach mózgu a rozwojem chorób neurodegeneracyjnych [20]. Zmiany tego parametru były połączone z ogólnym wzrostem stresu w komórkach, wpływając również na funkcjonowanie lizosomów [21].

Należy podkreślić, że zmiany lepkości są dość często związane z genezą wielu chorób. W związku z tym w literaturze można znaleźć liczne przykłady sond dwufunkcyjnych łączących odwracalne i nieodwracalne interakcje, które mają na celu wykrycie docelowego analityka oraz lokalnej

lepkości. Większość tych sond jest ukierunkowana na cząsteczki sygnalizacyjne – małe cząsteczki, jony lub rodniki, biorące udział w szlakach sygnalizacyjnych w obrębie komórki. Odwracalność sondy jest zwykle osiągnięta, gdy sonda może działać jako rotor molekularny, a jednocześnie posiada w swojej strukturze część reagującą na dany analityk. Rotor molekularny składa się z dwóch symetrycznych małych sprzężeń π , w których cząsteczki akceptora elektronów (A) i donora elektronów (D) są połączone wiązaniem, tworząc strukturę D- π -A. Wewnątrzcząsteczkowe ograniczenie rotacji spowodowane zwiększoną lepkością powoduje zahamowanie nieradiacyjnego procesu relaksacji pod wpływem TICT, co prowadzi do wzrostu emisji fluorescencji sondy.

Li i in. zaproponowali czułą na lepkość sondę H-V działającą wg przedstawionego wyżej mechanizmu w przypadku zmian lepkości mikrośrodowiska [22]. Dodatkowo może ona również monitorować rodnik $\cdot\text{OH}$ w wyniku reakcji (hydroksylacji) w pozycji meta grupy metoksyłowej,



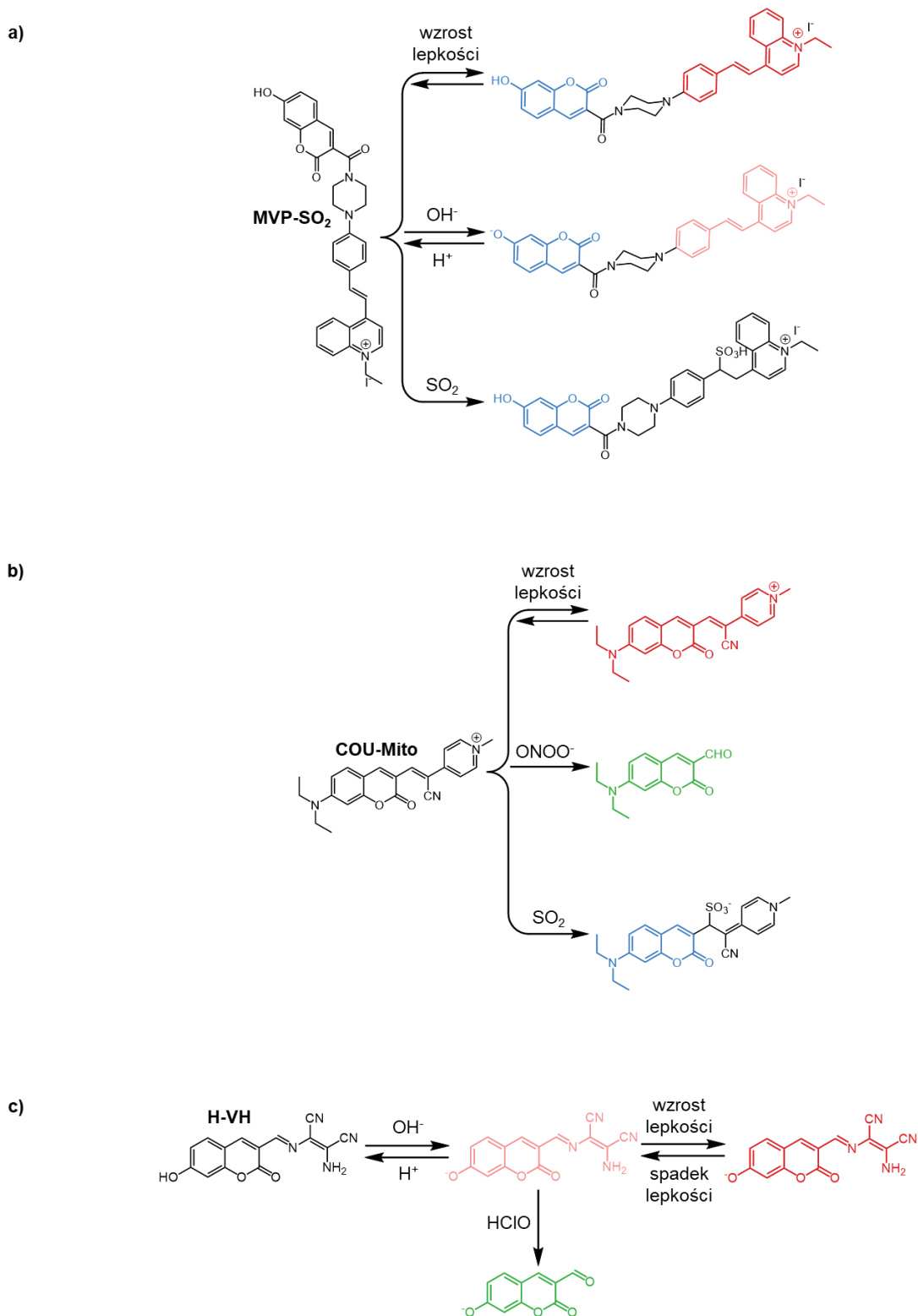
Rycina 5. Struktury sond i mechanizmy wykrywania analitów: a) zmian lepkości i obecności GSH FPY [25]; b) zmian lepkości i obecności NTR CQ-1 [26]. Kolory cząsteczek (czerwony, zielony, pomarańczowy) oznaczają odpowiednio kolor emisji sondy w odpowiedzi na wybrany analit, podczas gdy czarny kolor oznacza cząsteczkę nieaktywną (brak emisji). GSH – glutation; NTR – nitroreduktaza.

w wyniku czego tworzy się fenolowy produkt pośredni. Produkt ten ulega następnie deprotonacji i przegrupowaniu elektronów, powodując zwiększenie π -sprężonego systemu (Ryc. 4a). Nowopowstały układ sprężony π powoduje duże spektralne przesunięcie ku czerwieni (ang. *near infrared*, NIR) i ostro skonstruowaną fluorescencyjną odpowiedź NIR off-on, w porównaniu z zieloną fluorescencją off-on spowodowaną zmianami lepkości. Sonda zapewniła unikalny wgląd w związek między zmianami lepkości a obecnością rodnika hydroksylowego podczas ferroptozy, stosunkowo nowej formy regulowanej śmierci komórki.

Inny przykład sondy wrażliwej na zmiany lepkości i cząsteczki sygnalizacyjne został przedstawiony przez Zhang, J. i in. [23]. Anormalna lepkość i stężenie nadtlenoazotynu (ONOO^-) są ściśle związane z procesami właściwymi cukrzycy. Autorzy zaprojektowali i otrzymali cząsteczkę AO, która była selektywnie transportowana w kierunku mitochondriów i wykrywała lokalne zmiany lepkości (Ryc. 4b). Mechanizm detekcji był podobny do poprzedniego przykładu sondy, tj. wzrost lepkości mikrośrodowiska skutkował zmniejszeniem rotacji wewnątrzcząsteczkowej i wzrostem emisji sygnału fluorescencyjnego sondy. Jednocześnie cząsteczka nieodwracalnie reagowała z anionem nadtlenoazotynu i tworzyła pochodną sondy ukierunkowaną na krople lipidowe ze znaczącą zmianą emisji długości fali fluorescencji. Sonda została z powodzeniem zobrazowana wewnątrz kropli lipidowych i mitochondriów, wykazując oddzielną dla tych organelli dwukanałową fluorescencję. Wahania lepkości wewnątrz komórek, zwłaszcza wewnątrz mitochondriów, zostały dodatkowo powiązane z genetyką choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, chorób sercowo-naczyniowych i starzenia się, a także szeroko pojętej kancerogenezy. Związek między kolejną cząsteczką sygnalizacyjną, SO_2 a lepkością był badany przez kilka grup badawczych, w tym wyjątkowo w mitochondriach. Zhang, X. i in. stworzyli cząsteczkę Mito-Th, która jednocześnie wyczuwa zmiany lepkości poprzez mechanizm TICT oraz obecność cząsteczki SO_2 (Ryc. 4c) [24]. Podwójne wiązanie sondy zostaje podstawione i podstawione przez cząsteczkę dwutlenku siarki, co

w efekcie powoduje zmianę absorpcji i emisji fluorescencji cząsteczki w kierunku krótszych fal.

Zbadano również związek między zmianami lepkości wewnątrz komórek oraz obecnością peptydów czy białek. Cząsteczka FPY, zaprojektowana przez Wang i in., jest transportowana w komórkach do 3 różnych organelli: mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego i jąderka [25]. Co istotne, sonda ta została wykorzystana, podobnie jak wcześniej wspomniana H-V, do wykrywania ferroptozy, czyli procesu śmierci komórkowej wywołanego w wyniku podwyższonego poziomu labilnych form jonów żelaza i podwyższonego stresu oksydacyjnego (Ryc. 5a). Cząsteczka, jak kilka wyżej opisanych przykładów, jest zdolna do rotacji, a także posiada pierścień piperazynowy, który ma kilka znanych konformacji. Obecność pierścienia piperazynowego w tej samej płaszczyźnie co reszta cząsteczki w zatłoczonym, lepkiem środowisku powoduje zależne od lepkości wzmocnienie zielonej fluorescencji. Wykrywanie peptydu glutationu (GSH), najpowszechniej występującego bio-reduktora, opiera się zaś na podstawieniu pierścienia ksantenu przez GSH. Powoduje to przerwanie sprężonego układu wiązań podwójnych i zmianę fluorescencji na czerwoną. Cząsteczkę zvalidowano *in vitro*, jak i w komórkach z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Kolejnym przykładem sondy dwuanalitowej, tym razem selektywnej wobec większego celu molekularnego jakim jest białko, jest przygotowana przez Du i in. sonda CQ-1 [26]. Zawiera ona część cząsteczki, której fluorescencja bazuje na mechanizmie TICT oraz grupę $-\text{NO}_2$, która może zostać zredukowana do $-\text{NH}_2$ dzięki interakcji z nitroreduktazą (NTR), a następnie wyeliminowana poprzez przegrupowanie sondy (Ryc. 5b). Eliminacja części cząsteczki skutkuje inną długością fali emisji fluorescencji, co pozwala na wyraźne rozróżnienie między cząsteczkami, które już oddziaływały z nitroreduktazą oraz wyjściową formą sondy. Podwyższony poziom nitroreduktazy może być wykorzystywany jako ważny biomarker wczesnego stadium raka. Jednocześnie nowotwory złośliwe wykazują nieprawidłowe zmiany w lepkości komórek. Zbadanie zależności między tymi dwoma czynnikami, lepkością i poziomem NTR, może zapewnić niezwykłą



Rycina 6. Struktury sond i mechanizmy wykrywania analitów: a) zmian lepkości, pH i obecności SO₂/HSO₃⁻ MVP-SO₂ [27]; b) zmian lepkości, obecności ONOO⁻ i SO₂/HSO₃⁻ COU-Mito [28]; c) zmian lepkości, pH i obecności ClO⁻/HClO H-VH [29]. Kolory cząsteczek (czerwony, zielony, niebieski) oznaczają odpowiednio kolor emisji sondy w odpowiedzi na wybrany analit, podczas gdy czarny kolor oznacza cząsteczkę nieaktywną (brak emisji). Jasnoróżowy kolor przedstawia małą intensywność emisji czerwonej.

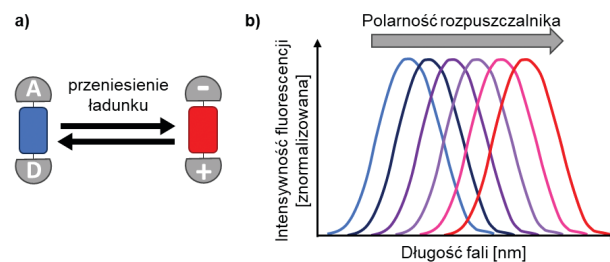
perspektywę we wczesnej diagnostyce rozwijającego się nowotworu. Sonda została z powodzeniem wprowadzona do żywych komórek oraz modelu zwierzęcego (tzw. ryby z gatunku danio przegowany, ang. *zebrafish*).

Podjęto także próby opracowania sond czułych na lepkość oraz dwa dodatkowe anality. Takim przykładem jest sonda MVP-SO₂, opracowana przez grupę Zhan i in., której fluorescencja wrażliwa jest na wykrywane w mikrośrodkowisku mitochondriów wahania lepkości, zmiany pH i

obecność SO_2 (Ryc. 6a) [27]. W tym samym roku Zheng i in. opublikowali pracę przedstawiającą cząsteczkę COU-Mito, zdolną do detekcji zmian w lepkości, a także obecność SO_2 oraz ONOO^- (Ryc. 6b) [28]. Sonda skutecznie wychwyciła zmiany w lepkości mitochondriów i fluktuacje w mitochondrialnych poziomach ONOO^- i SO_2 w żywych komórkach i *in vivo* w modelu rybim danio przegowanego. Zbadano również ich udział w hepatotoksycznym działaniu acetaaminofenu, powszechnie używanego leku przeciwbólowego i przeciwgorączkowego. Zastosowanie to zapewnia nowe spojrzenie na wykorzystanie sond wieloanalitowych w badaniach genów skutków ubocznych dobrze znanych leków, które zostały zatwierdzone do użytku przed laty. Ostatni przykład sondy wykrywa zmiany lepkości, pH i ClO^- oraz pozwolił na zbadanie wzajemnego oddziaływania wszystkich trzech analitów w przewlekłych ranach związanych z przebiegiem cukrzycy, które stanowią duże wyzwanie podczas monitorowania już zdiagnozowanej choroby. Chai i in. stworzyli H-VH, prostą w strukturze, potrójnie reagującą cząsteczkę, która w stanie „wyłączonym”, bez obecności wysokiego poziomu lepkości środowiska lub obu analitów nie wykazuje fluorescencji (Ryc. 6c) [29]. Po wykryciu zmiany pH ulega deprotonacji i jest w stanie wykryć obecność HClO (co skutkuje eliminacją części cząsteczki, zielona fluorescencja) lub zmianę lepkości (czerwony sygnał fluorescencyjny).

WIELOANALITOWE SONDY WRAŻLIWE NA ZMIANY POLARNOŚCI

Główna klasyfikacja sond wrażliwych na zmiany polarności (często nazywane solwatochromowymi, gdyż kolor ich fluorescencji jest zależny od rodzaju i polarności rozpuszczalnika) jest zwykle tworzona w oparciu o ich docelową lokalizację wewnątrzkomórkową. W ten sposób możemy podzielić sondy, na takie, które są skierowane do mitochondriów, lizosomów, retikulum endoplazmatycznego, aparatu Golgiego i kropli lipidowych [30]. Barwniki fluorogeniczne wrażliwe na polarność cieszą się dużym zainteresowaniem w mikroskopii konfokalnej i wysokorozdzielczej ze względu na zmianę ich fluorescencji po interakcji z celami biologicznymi, umożliwiając obrazowanie z lepszym stosunkiem sygnału do tła [31]. Z kilku mechanizmów opisanych w poprzednim podrozdziale, sondy solwatochromowe działają głównie w oparciu o mechanizm push-pull. Zawierają one grupy donorujące elektrony (grupy donorowe, D) i grupy akceptujące elektrony (akceptorowe, A), a po absorpcji światła ładunek przenosi się z grupy donorowej do akceptorowej, powodując powstanie wysoce dipolarnego stanu wzbudzonego (Ryc. 7a). Cząsteczka w stanie wzbudzonym następnie ulega modyfikacjom przestrzennym w celu lepszej stabilizacji przez cząsteczki rozpuszczalnika (najczęściej dipole) przed emisją światła. Polarne rozpuszczalniki silniej oddziałują z często bardziej polarnymi stanami wzbudzonymi fluoroforów, prowadząc do większej stabilizacji tych ostatnich i tym samym przesunięcia energii emisji w kierunku dłuższych fal. Zwykle reakcja sond wrażliwych na zmiany polarności jest widoczna jako zmiana maksimum widma emisji fluorescencji lub zarówno widma absorpcji, jak i widma emisji (Ryc. 7b) [16].

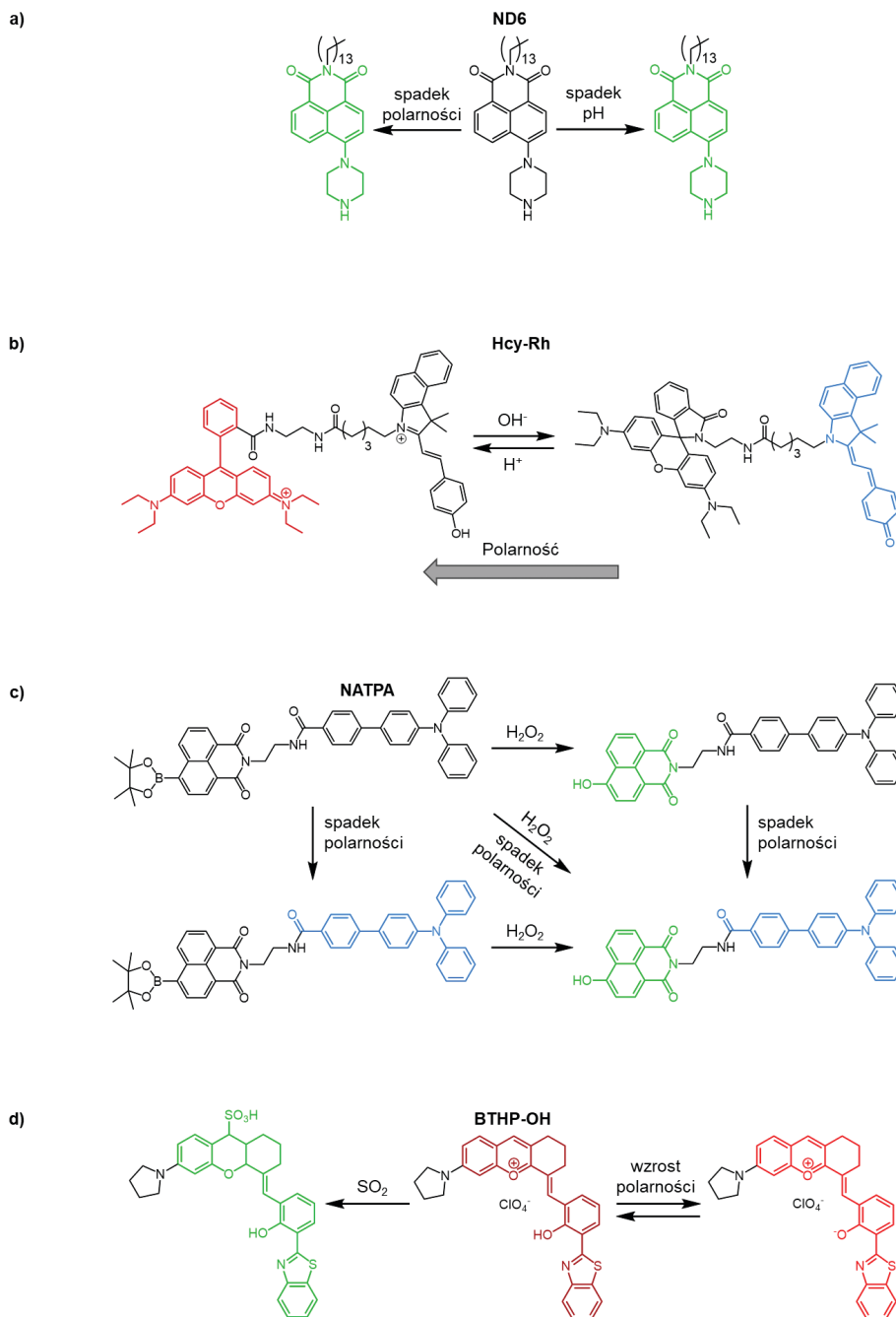


Rycina 7. Schematyczne przedstawienie charakterystyki sond wrażliwych na zmiany polarności: a) Uproszczony mechanizm detekcji solwatochromowej barwników typu push-pull związany z przeniesieniem ładunku w obrębie cząsteczki. b) Schemat zmienności widm emisji w zależności od polarności rozpuszczalnika. D - donor; A - akceptor. Kolory krzywych symbolicznie obrazują stopniową zmianę kolorów emisji wraz ze zmianą polarności użytego rozpuszczalnika, od niebieskiej fluorescencji o najwyższej energii po czerwoną emisję o najniższej energii.

Podobnie jak lepkość, zmiany polarności wewnątrz komórek mogą być powiązane z wieloma procesami wpływającymi na prawidłowe funkcjonowanie komórek. Oprócz ogólnego wykrywania polarności komórkowej w organelach i strukturach subkomórkowych lub badania organizacji błony komórkowej [32], zmiany tego parametru były wykorzystywane jako marker procesów patogenezy. Naukowcy badali fluktuacje polarności w komórkach spowodowane sftuszczeniem wątroby [33], obserwowali wzrost polarności wewnątrz aparatów Golgiego podczas ostrego uszkodzenia nerek wywołanego lekami [34], obrazowali organelle i ich błony pod wpływem stresu oksydacyjnego i mechanicznego [35], badali heterogeniczność podczas procesu agregacji białek w komórkach [36], monitorowali dysfunkcję mitochondriów i ostre zapalenie trzustki [37] czy badali przebieg infekcji wirusowej komórek [38].

Badając zmiany polarności wewnątrz komórek można wykorzystać już dostępne dane dotyczące dobrze scharakteryzowanych rozpuszczalników nieorganicznych i organicznych oraz porównać zachowanie sond *in vitro* i *in cellulo*, korelując kolor fluorescencji z konkretnymi parametrami polarności danego rozpuszczalnika. W ten sposób możliwa jest swoista kwantyfikacja fluktuacji polarności środowiska wewnątrzkomórkowego [39]. Podczas gdy w literaturze zaprezentowano wiele sond w oparciu o hydrofobowość lub hydrofilowość, co skutkuje ich specyficzną migracją w kierunku wybranych organeli, w niniejszej pracy skupimy się głównie na tych, których fluorescencja ulega zmianie pod wpływem różnicy w polarności środowiska oraz przynajmniej jeszcze jednego wybranego analitu.

Pierwszym zaprezentowanym w obecnym opracowaniu przykładem sondy dwuanalitowej wrażliwej na zmiany polarności jest oparta na strukturze naftalimidu sonda ND6 z elementem wrażliwym na zmiany pH, opracowana przez Thomasa i in. Protonowanie podstawnika aminowego powoduje w niej znaczny wzrost emisji poprzez zahamowanie wygaszania fluorescencji opartego na PeT, tj. foto-indukowanym transferze elektronu (ang. *photo-induced electron transfer*) (Ryc. 8a) [40]. Sonda znakuje błonę komórkową i została z powodzeniem zastosowana w komórkach nowotworowych oraz sferoidach nowotworowych. Widoczna jest różnica sygnału fluorescencji między pH 6 i 7, co do-

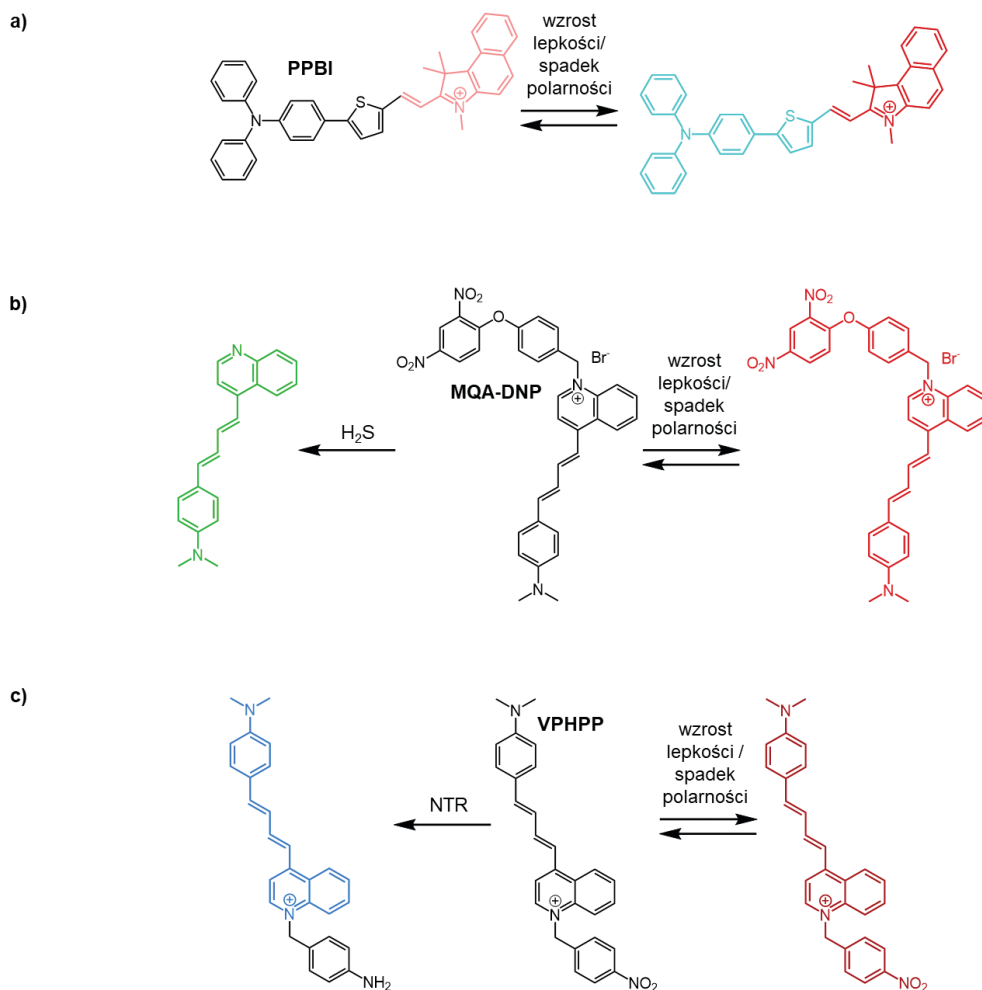


Rycina 8. Struktury sond i mechanizmy wykrywania analitów: a) zmiany polarności i pH ND6 [40]; b) zmiany polarności i pH Hcy-Rh [41]; c) zmiany polarności i obecności H_2O_2 NATPA-OH [42]; d) zmiany polarności i obecności SO_2 BTHP [43]. Kolory cząsteczek (czerwony, ciemnoczerwony, zielony, niebieski) oznaczają odpowiednio kolor emisji sondy w odpowiedzi na wybrany analit, podczas gdy czarny kolor oznacza cząsteczkę nieaktywną (brak emisji).

skonale koreluje ze średnią wewnątrzkomórkową wartością pH i czyni sondę ND6 dogodną do dalszych badań aplikacyjnych. Inny przykład o podobnej zasadzie działania został przedstawiony przez Bai i in. [41]. Sonda Hcy-Rh różni się od wcześniej opisanych cząsteczek tym, że zawiera dwa różne fluorofory, które są kowalencyjnie połączone, co pozwala zmierzyć stosunek między dwoma sygnałami fluorescencyjnymi (takie sondy nazywane są sondami "różnicowymi") (Ryc. 8b). Cząsteczka Hcy-Rh składa się z części rodaminowej i hemicyjaninowej. Część rodaminowa ulega otwarciu po protonowaniu wskutek spadku pH, dzięki czemu obserwowany jest wzrost intensywności emisji przy długości fali 580 nm lub może ulec zamknięciu, wówczas

zamiast emisji rodaminowej obserwuje się emisję hemicyjaniny przy długości fali 450 nm. Dodatkowo, forma otwarta jest transportowana do mitochondriów, a zamknięta do lizosomów. Przedstawiona sonda różnicowa została dokładnie zbadana, zarówno *in vitro*, jak i *in cellulo* w komórkach nowotworowych.

Związek między polarnością a cząsteczkami sygnałowymi został zbadany m.in. przez Li i in., którzy opublikowali artykuł badający związek między wewnątrzkomórkowymi zmianami polarności a obecnością nadtlenu wodoru (H_2O_2) [42]. Nadtlenek wodoru, najtrwalsza endogenna reaktywna forma tlenu, powstaje głównie w mitochondriach

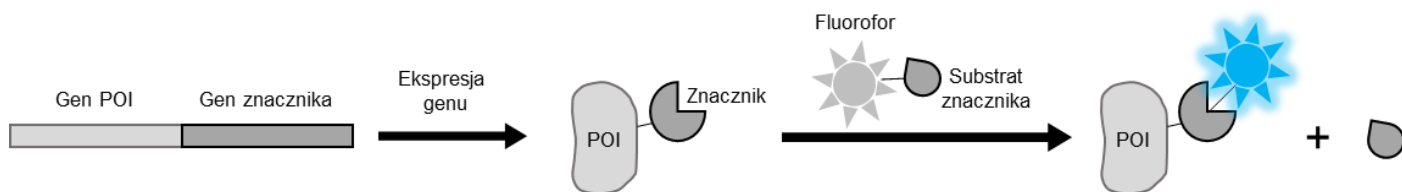


Rycina 9. Struktury sond i mechanizmy wykrywania analitów: a) zmiany w lepkości i polarności PPBI [2]; b) zmiany w lepkości, polarności i obecności H_2S MQA-DNP [44]; c) zmiany w lepkości, polarności i obecności NTR VPHPP [45]. Kolory cząsteczek (czerwony, zielony, cyjanowy, niebieski) oznaczają odpowiednio kolor emisji sondy w odpowiedzi na wybrany analit, podczas gdy czarny kolor oznacza cząsteczkę nieaktywną (brak emisji). Jasnoróżowy kolor przedstawia małą intensywność emisji czerwonej. NTR – nitroreduktaza.

i odgrywa kluczową rolę jako cząsteczka sygnałowa w cyklu komórkowym. Głównym celem zastosowania NATPA było przyjrzenie się kroplom lipidowym, gdzie zmiany polarności mają ogromny wpływ na metabolizm lipidów i interakcje białko-białko (Ryc. 8c). Eksperymenty zostały pomyślnie przeprowadzone na komórkach nowotworowych. Zhang S. i in. wykonali także dalsze badania zależności między zmianami polarności a cząsteczkami sygnałowymi z wykorzystaniem sondy BTHP-OH (Ryc. 8d) [43]. Ukierunkowana na mitochondria w komórkach nowotworowych cząsteczka została ponadto z sukcesem wprowadzona do organizmów myszy. Dwukanałowe obrazowanie było możliwe dzięki znacznej zmianie maksimum emisji między 2 formami sondy, z 677 nm dla formy reagującej na SO_2 do 818 nm dla formy wrażliwej na zmiany polarności.

Opracowano także sondy, które łączą obie strategie wykrywania i umożliwiają użytkownikom przyjrzenie się zarówno zmianom lepkości, jak i polarności. Jednym z przykładów jest PPBI, pochodna benzimidolu wykazująca niezwykłą wrażliwość na wysoką lepkość lub niską polarność mikrośrodowiska (Ryc. 9a) [2]. Została ona z powodzeniem wprowadzona do organizmów myszy w celu zbadania patogenezy alkoholowego ostrego uszkodzenia wątro-

by. Podwójna wrażliwość na zmiany w mikrośrodowisku była dalej badana przez Zana i in., którzy stworzyli sondę MQA-DNP, dodatkowo zdolną do wykrywania obecności H_2S (Ryc. 9b) [44]. Cząsteczka H_2S może być uważana za dodatkowy biomarker, obok lepkości i polarności, ze względu na jej rolę w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Mechanizm działania MQA-DNP opiera się zarówno na TICT, jak i ESIPT (wewnątrzcząsteczkowy transfer protonu w stanie wzbudzonym, ang. *excited state intramolecular proton transfer*), a wykrycie analitów skutkuje 66-krotnym wzrostem sygnału fluorescencyjnego. Dwukanałowe obrazowanie umożliwiło szczegółowe spojrzenie na zmiany wynikające z niealkoholowego stłuszczenia wątroby oraz tkankę nowotworową. Zaobserwowano, że komórki zapalne wykazują wzrost poziomu H_2S i lepkości. Cząsteczka MQA-DNP wykazuje zatem potencjał do wykorzystania w badaniu chorób związanych z mitochondriami, a nawet w chirurgii kierowanej obrazowaniem. Inna potrojnie reagująca sonda, którą z powodzeniem wprowadzono do żywych komórek, została zaprojektowana przez Qi i in. [45]. W oparciu o zwiększony poziom nitroreduktazy (NTR) VPHPP umożliwiła wgląd w stan niedotlenienia komórek, zapewniając unikalny wgląd w mikrośrodowisko nowotworowe (Ryc. 9c). Dodatkowo, autorzy byli w stanie odróżnić zdrowe i nowotworowe ko-



Rycina 10. Uproszczony mechanizm reakcji znakowania między substratem-fluoroforem a znacznikiem połączonym z POI (ang. *protein of interest*) (zaadaptowano z [50]).

mórki za pomocą sondy, wykorzystując technikę mikroskopii konfokalnej.

WIELOANALITOWE SONDY FLUORESCENCYJNE DO BADANIA MIKROŚRODOWISKA BIAŁEK

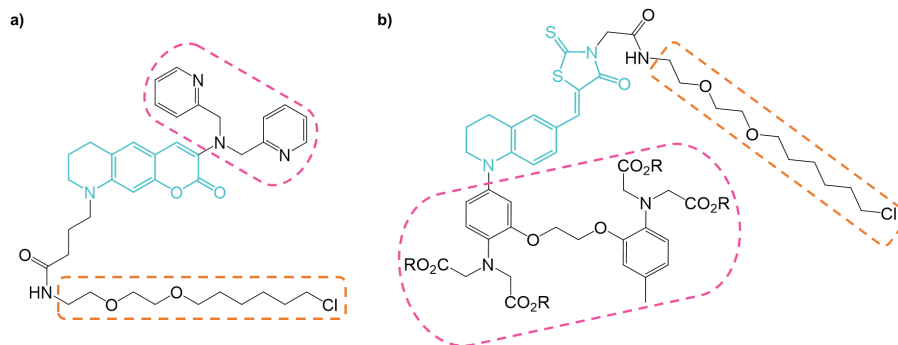
Spośród wielu potencjalnych celów molekularnych, białka wydają się być szczególnie interesujące. Znaczenie tych makrocząsteczek w niezliczonych procesach jest niezaprzeczalne [46]. Zbieranie informacji na temat ich molekularnego zagęszczenia i fluktuacji parametrów fizycznych w ich otoczeniu może wzbogacić naszą wiedzę na temat wielu chorób, w których nieprawidłowe funkcjonowanie białek odgrywa kluczową rolę, a także przyjrzeć się prawidłowo zachodzącym procesom fizjologicznym. Stwierdzono, że lokalne środowisko w okolicach białka może wpływać na jego funkcję [47, 48], podczas gdy środowisko wewnątrzkomórkowe ma wpływ na interakcje między białkami [49]. Aby dalej badać w jaki sposób zmiany mikrośrodowiska wpływają na złożone procesy z udziałem białek, należałoby uporać się ze złożonością, rozmiarem i mnogością możliwych mikrozmian wokół białek. Kolejnym wyzwaniem byłoby zaprojektowanie cząsteczki selektywnie wiążącej się z białkiem i wystarczająco czulej, aby być w stanie pokazać nam te zmiany.

Kluczowym elementem niezbędnym do badania bezpośredniego otoczenia białek jest dostarczenie sondy w jego pobliżu. Jednym ze sposobów zapewnienia selektywności sondy względem konkretnego białka jest dołączenie do niego tzw. znacznika białkowego, który jest zdolny do selektywnej reakcji z małą cząsteczką (substratem, Ryc. 10, zaadaptowano z [50]). Do tej klasy znaczników należą m.in. SNAP-tag, HaloTag czy CLIP-tag [51]. Szczegółowe właściwości i ograniczenia tych znaczników zostały opisane w szeregu artykułów przeglądowych (m.in. [52]) i nie będą

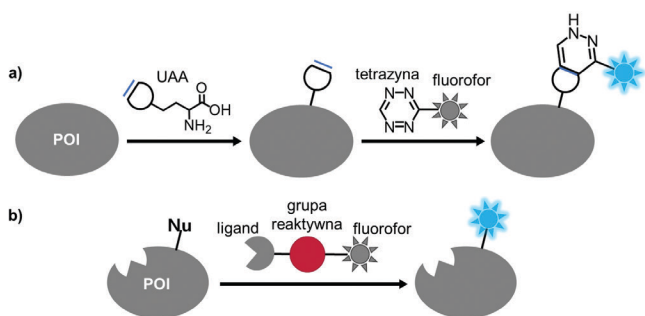
przedmiotem dalszej analizy w tym artykule, gdzie skupimy się na substratach tych znaczników.

Aby umożliwić bezpośrednie i specyficzne badanie białek w komórkach bez potrzeby odmywania niezwiązanych substratów z wnętrza komórek w celu usunięcia fluorescencji tła, opracowano szereg substratów fluorogennych. Substraty te oparte są zazwyczaj o fluorofory czułe na zmiany fizycznych parametrów środowiska jak polarność czy lepkość. Wiązanie tych substratów do powierzchni białka oznacza, że fluorofory znajdują się w innym mikrośrodowisku (o innej lepkości i polarności) w porównaniu z substratami niezwiązanymi. To z kolei wywołuje zmianę właściwości spektralnych tych cząsteczek, które w tym układzie działają jak sondy jednoanalitowe na parametry fizyczne mikrośrodowiska. Dodatkowo posiadają one zdolność selektywnego przyłączania się do genetycznie znakowanych celów białkowych. Przez wprowadzenie do tych sond grup responsywnych, oddziałujących z innymi analitami biochemicznymi, powstają *de facto* sondy dwuanalitowe.

Dotychczas opisano kilka substratów/sond fluorogennych, zbudowanych z fluorogenu zawierającego chelator jonów metali, który staje się fluorescencyjny dopiero po związaniu kationu i przyłączeniu do białka (zmianie polarności/lepkości). Sondy takie pozwalają na detekcję labilnych form jonów metali, czyli nietrwałych i przejściowych kompleksów z małowcząsteczkowymi ligandami w porównaniu z dużo bardziej kinetycznie i termodynamicznie stabilnymi kompleksami jonów z białkami. W związku z tym, labilne formy jonów metali pełnią w praktyce kluczowe funkcje regulatorowe i stanowią rezerwuar jonów dla funkcjonalnych białek. Dwoma przykładami dla znacznika HaloTag są ZnDA-1H (Ryc. 11a) wrażliwa na obecność jonów Zn^{2+} [53] oraz Ca-DIP (Ryc. 11b) posiadająca element wykrywający jony Ca^{2+} [54]. Użycie sondy otrzymanej przez Kowada i in., ZnDA-1H, umożliwiło ilościowe oznaczenie



Rycina 11. Budowa dwuanalitowych sond dla znacznika HaloTag: a) ZnDA-1H wykrywającej obecność jonów Zn^{2+} [53] oraz b) Ca-DIP selektywnej wobec jonów Ca^{2+} [54]. Fluorofory oznaczone są kolorem turkusowym, substraty dla HaloTag otoczone pomarańczową przerywaną linią, zaś chelatory dla metali przerywaną różową linią.



Rycina 12. Wybrane przykłady typów znakowania białek endogennych i ich mechanizmów znakowania: a) chemia click i ekspansja kodu genetycznego (zaadaptowano z [60]); b) znakowanie oparte na powinowactwie (zaadaptowano z [59]). POI - ang. *protein of interest*, tj. cel białkowy; UAA - ang. *unnatural amino acid*, tj. aminokwas niebiogeny, selektywnie reagujący z tetrazyną; Nu - nukleofilowa grupa na powierzchni POI, atakująca grupę reaktywną podczas znakowania.

labilnych jonów Zn^{2+} w aparacie Golgiego. Zdecydowaną zaletą tej sondy jest mniejsza zależność jej działania od zmian pH, co często stanowi problem w przypadku stosowania tzw. fluorescencyjnych białek, np. GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*). Drugi przykład takiej sondy został zaprojektowany i zsyntetyzowany przez Bachollet i in. Sonda Ca-DIP z podwójnym sygnałem wejściowym działa jak fluorescencyjna bramka logiczna typu AND. Dzięki obecności w cząsteczce grupy chelatującej BAPTA, wrażliwej na obecność Ca^{2+} , część fluorogeniczna staje się fluorescencyjna tylko po związaniu jonu metalu i zmianie polarności/lepkości mikrośrodowiska w wyniku przyłączenia sondy do białka. Oprócz klasycznych parametrów fluorescencyjnych wykorzystywanych do pomiaru zmian w mikrośrodowisku, jak intensywność i kolor, zbadano także czas życia fluorescencji, który jest wrażliwy na wahania lepkości i polarności otoczenia [55,56].

Opracowanie substratów fluorogennych znaczników białkowych, które jednocześnie są czułe na zmiany mikrośrodowiska/obecność analitów, pozwala na ich zastosowanie do dowolnych celów białkowych, pod warunkiem uprzedniego przyłączenia znacznika białkowego do danego celu białkowego (tzw. POI - ang. *protein of interest*). Należy jednak być ostrożnym i świadomym, że chociaż sama technologia znaczników białkowych ma ogromny potencjał do bycia wprowadzoną w wielu systemach i dalszego rozwoju, wymaga ona wprowadzenia genu fuzyjnego do komórek, uniemożliwiając badanie endogennych białek. Co więcej, obecność znacznika połączonego z POI może istotnie wpłynąć na funkcję POI. Skutkiem tego, wyniki eksperymentu mogą nie przekładać się bezpośrednio na izolowane, endogenne POI w komórkach (przykład: [57]). Aby pokonać te dwie przeszkody, obecne technologie stosowane do znakowania endogennych białek są dalej optymalizowane [58,59]. Z szerokiej gamy dostępnych alternatyw, przykładowo zastosowanie wyraźnie mniejszych znaczników zawierających substrat dla chemii click wraz z techniką ekspansji kodu genetycznego, choć obecnie bardzo złożone i wymagające modyfikacji genetycznej modelu biologicznego, ma ogromny potencjał (Ryc. 12a) [60]. Kolejnym przykładem technologii jest użycie sond znakujących opartych na powinowactwie (ang. *affinity-based probes*) (Ryc. 12b) [59]. Obie techniki charakteryzują się możliwością dostosowywania konstrukcji sond do pożądanego

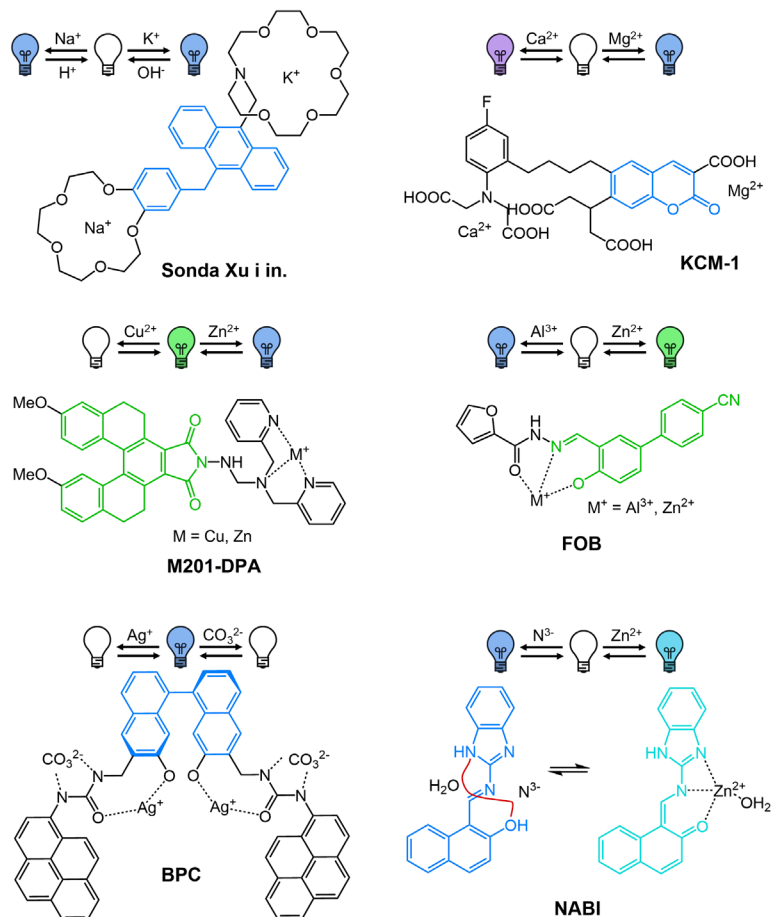
celu, przy czym pierwsza z nich wymaga konieczności modyfikacji genetycznej celu białkowego.

SONDY FLUORESCENCYJNE DO WYKRYWANIA KILKU ANALITÓW BIOCHEMICZNYCH JEDNOCZEŚNIE

Przed dokładniejszą analizą klasycznych przykładów fluorescencyjnych sond dwuanalitowych, chcielibyśmy zwrócić uwagę na strategie stosowane do uzyskania wspomnianej wyżej specyficznej lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Jest to szczególnie interesujące w kontekście tego, że określony proces fizjologiczny i/lub patologiczny zazwyczaj może zachodzić jedynie w danym przedziale komórkowym lub organelli. Typowym podejściem do kierowania sondy w stronę określonego organellum jest zastosowanie dodatkowego fragmentu, zapewniającego transport cząsteczki do wybranego miejsca w obrębie komórki i akumulacji sondy w określonym regionie zainteresowania. Między innymi, ukierunkowanie mitochondrialne uzyskuje się poprzez obecność dodatnio naładowanych elementów w strukturze sondy (najczęściej kationów lipofilowych o niskiej gęstości ładunku), które oddziałują elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi błonami mitochondrialnymi. Kilka przykładów obejmuje ANET [61] czy Mito-CM-CD [62], w którym sam fluorofor jest dodatnio naładowanym kationem etylobenzotiazoliowym, a zatem działa również jako część ukierunkowująca całą cząsteczkę ku mitochondriom. W przypadku celowania lizosomalnego najczęściej stosowaną grupą kierującą jest morfolina, która wykazuje stan uprotonowany w naturalnie występującym kwaśnym pH w lizosomach. Taka pH-czuła grupa kierująca jest zawarta np. w następujących sondach: SC [63], ONOO-LysopH [64], HPFR [65], MLC [66]. Co więcej, wymienione grupy kierujące mogą pełnić także funkcję responsywną, rozszerzając niejako liczbę wykrywanych analitów przez daną sondę. Przykładem jest wyżej wymieniona grupa morfolinowa, której uprotonowanie powoduje różnicę w odpowiedzi fluorescencyjnej sondy (ze względu np. na zmianę komunikacji elektronowej między grupą a fluoroforem).

ODWRACALNE DWUANALITOWE SONDY FLUORESCENCYJNE

Odwracalne wykrywanie poprzez oddziaływania koordynacyjne lub kompleksowe jest wykorzystywane głównie do wykrywania jonów metali, ale także anionów i pH (czyli *de facto* stężenia protonów). Monitorowanie jonów metali w modelach biologicznych jest ważne ze względu na ich udział w procesach fizjologicznych i patologicznych (związanych głównie z zaburzeniem równowagi redoks i toksycznością, jak i jako elementy terapii). W przypadku sond dwuanalitowych nakierowanych na jony metali, powinny one zawierać dwa fragmenty responsywne, takie jak selektywne ligandy dla dwóch docelowych metali. Xu i in. byli pionierami w opracowaniu sondy fluorescencyjnej do jednoczesnego wykrywania dwóch kationów metali: Na^{+} i K^{+} [67]. Ich projekt oparty był na antracenie i zawierał dwa motywy rozpoznawcze do chelatowania jonów sodu lub potasu. Specyficzność tej sondy była jednak ograniczona ze względu na potencjalną odpowiedź również względem innych jonów metali (rubid i wapń) oraz zależność fluorescencji od pH. Komatsu i in. opracowali KCM-1, która może wykrywać Ca^{2+} i Mg^{2+} [68]. Cząsteczka składa się z fluoroforu kumarynowego i połączonego



Rycina 13. Struktury sond odwracalnych wraz z wykrywanymi analitytami. Wyszczególnione kolorem elementy cząsteczek przedstawiają ich część odpowiedzialną za emisję wraz z potencjalnym kolorem fluorescencji. Symbole żarówek przedstawiają kolory emisji w odpowiedzi na wybrany analityt, podczas gdy żarówka biała oznacza cząsteczkę nieaktywną (brak emisji). Czerwona linia dla sondy NABI symbolizuje powstanie sztywnej supramolekularnej struktury dzięki wiązaniom wodorowym.

nych z nim dwóch motywów wiążących (jednego dla jonów wapnia i jednego dla jonów magnezu). Kompleksowanie Ca^{2+} powoduje przesunięcie hipsochromowe absorpcji (o 45 nm), jak i niewielką zmianę długości emisji (o 5 nm) poprzez mechanizm wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ładunku, tzw. ICT (ang. *intramolecular charge transfer*). Związanie magnezu powoduje przesunięcie absorpcji o 21 nm i emisji o 5 nm w prawo. Obserwacja odpowiedzi fluorescencyjnej przy trzech długościach fali wzbudzenia umożliwiła pomiar stężeń Ca^{2+} i Mg^{2+} w symulowanych warunkach biologicznych *in vitro*. Po tych wczesnych przykładach opublikowano kilka kolejnych sond do jednoczesnego wykrywania dwóch analitytów poprzez mechanizm koordynacji, ale tylko kilka z nich z powodzeniem zidentyfikowało jednoczesną obecność dwóch jonów metali. Poniżej przedstawiono kilka istotnych przykładów takich sond. Sonda oparta na rezonansowym przeniesieniu energii fluorescencji, tzw. FRET (ang. *Förster resonance energy transfer, fluorescence resonance energy transfer*) do wykrywania zarówno Fe^{3+} jak i Hg^{2+} została zaprojektowana przez Zhou i in. [69]. Zawiera ona tryptofan (donor 1), dansyloamid (akceptor 1, donor 2) i rodaminę B (akceptor 2). Cząsteczka może być wzbudzana odpowiednio przy 290 nm (wzbudzenie tryptofanu), 330 nm (wzbudzenie dansyloamidu) oraz 550 nm (wzbudzenie rodaminy). Hg^{2+} wygasza fluorescencję dansyloamidu przy 510 nm, ale Fe^{3+} otwiera pierścienie rodaminy i następuje emisja przy 580 nm. Zatem gdy dochodzi do chelatowania obu kationów, tylko rodamina B

emituje światło przy wzbudzeniu przy 550 nm. Niestety wysoka energia wzbudzenia (promieniowanie UV) ogranicza jej zastosowanie w modelach biologicznych. Kolejna dwuanalitytowa sonda to M201-DPA [70]. Została z sukcesem wykorzystana do selektywnego oznaczania Cu^{2+} lub Zn^{2+} . Ponadto, wykazuje duże przesunięcie Stokesa do ~150 nm, wygaszenie fluorescencji przy 524 nm dla Cu^{2+} i wzmocnienie fluorescencji przy 448 nm dla Zn^{2+} . Ostatni przykład to sonda FOB, która emituje fluorescencję przy 464 nm dla Al^{3+} i przy 512 nm dla Zn^{2+} w ludzkich komórkach raka okrężnicy [71].

Sondy reagujące na kation metalu i określony anion można także znaleźć w literaturze, choć nie jest to częsty przykład. Do takich sond należą BPC [72] i NABI [73]. Cząsteczka BPC oparta na koniugacie 1,1'-bi-2-naftolu i pirenenu wykazuje wysoką selektywność wobec jonów Ag^+ i CO_3^{2-} . Mechanizm wygaszania fluorescencji jest związany z występowaniem efektu fotoindukowanego przeniesienia elektronu, tzw. PeT (ang. *photo-induced electron transfer*) oraz efektem ciężkiego atomu. Z kolei NABI, sonda na bazie benzimidazolu oraz naftalenu jest w stanie wykrywać Zn^{2+} i N_3^- niezależnie, kolejno poprzez połączenie zarówno chelatowania, jak i tworzenie sztywnej supramolekularnej struktury wspomaganego tworzeniem wiązań wodorowych. Niemniej, biologiczne znaczenie większości par kation-anion nie zostało wyraźnie zdefiniowane, podobnie jak ich zastosowanie w modelach biologicznych w praktyce, co

wynika m.in. z trudności w selektywnym wiązaniu jonów metali w złożonym środowisku wewnątrzkomórkowym zawierającym bardzo wiele potencjalnych interferentów. Wymienione do tej pory odwracalne dwuanalitowe sondy zostały przedstawione na rycinie 13.

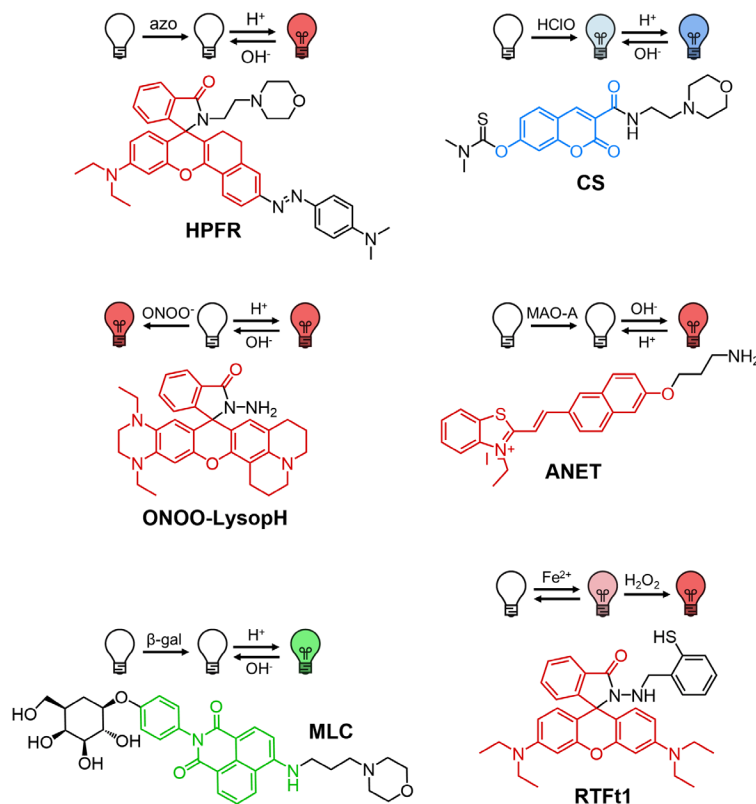
NIEODWRACALNE DWUANALITOWE SONDY FLUORESCENCYJNE

Nieodwracalne wykrywanie za pomocą sond fluorescencyjnych, które celują w wybrane organelle i wykrywają anality, najczęściej obejmuje reakcję między analitem a odpowiadającą mu cząsteczką wykrywającą, która trwale zmienia strukturę tego ostatniego. W tej sekcji za nieodwracalne sondy uznajemy te, które wykazują przynajmniej jedną nieodwracalną interakcję z jednym z dwóch analitów, zatem przedstawimy tutaj także wspomniane wcześniej tzw. „sondy mieszane”.

W ostatnich latach odnotowano zwiększenie liczby nowopublikowanych sond dwuanalitowych dla par związków chemicznych, które mogą być zaangażowane zarówno w procesy fizjologiczne, jak i patologiczne, w celu lepszego zrozumienia w jaki sposób te anality ze sobą współdziałają. Przykładowo, utrzymanie równowagi redoks i odpowiedniego wewnątrzkomórkowego pH ma zasadnicze znaczenie dla homeostazy komórek, a jej zaburzenie może mieć głęboki wpływ na początek choroby i skuteczność interwencji terapeutycznych [74]. Na równowagę redoks komórek ludzkich wpływa wiele elementów, z których najważniejsze to reaktywne formy tlenu ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $HClO$ i in.), reaktywne formy azotu ($ONOO^-$,

NO i in.), stężenie różnych form tlenu, stan kwasicy i redoks-aktywne jony metali, zwłaszcza żelaza(II).

W pierwszej kolejności skupimy się na niedawno opublikowanych sondach fluorescencyjnych, które wykrywają zmiany pH i jeden z wyżej wymienionych elementów wpływających na równowagę redoks. Ich struktury zostały przedstawione na rycinie 14. Cząsteczka HPFR składa się z trzech głównych części: grupy kierującej do lizosomów, azobenzenu jako grupy wygaszającej, części wykrywającej zmiany pH i obecność azoreduktazy (spiroolaktam antocyjanidyny) [65]. Redukcja HPFR w warunkach niedotlenienia jest katalizowana przez nitroreduktazę, uwalniając niefluorescencyjny spiroolaktam antocyjanidyny, który może być zależny od pH i odwracalnie zmieniony we fluorescencyjną formę otwartą. Jednak ze względu na silny efekt wygaszania przez azobenzen w warunkach normoksji (tj. zwykłego, fizjologicznego poziomu tlenu), pozostaje on niefluorescencyjny niezależnie od jego statusu kwasowego lub zasadowego. Innym przykładem tego typu sondy jest ONOO-LysopH na bazie rodaminy, która jest w stanie śledzić zmiany lizosomalnego pH i poziom $ONOO^-$, wykazując fluorescencję NIR przy 686 nm i 678 nm odpowiednio przy kwasowym i fizjologicznym pH [64]. Shi i in. opracowali CS, cząsteczkę ukierunkowaną na lizosomy do wykrywania pH i $HClO$ w żywych komórkach [63]. Jako grupę rozpoznającą $HClO$ zastosowano dimetylotiokarbaminian (DMTC) ze względu na jego szybką i selektywną reakcję utleniania pod wpływem tej cząsteczki sygnałowej. Morfolina została użyta nie tylko jako jednostka prowadząca do wnętrza lizosomów, ale także jako reporter pH, wraz z fenolową grupą hydroksylową.

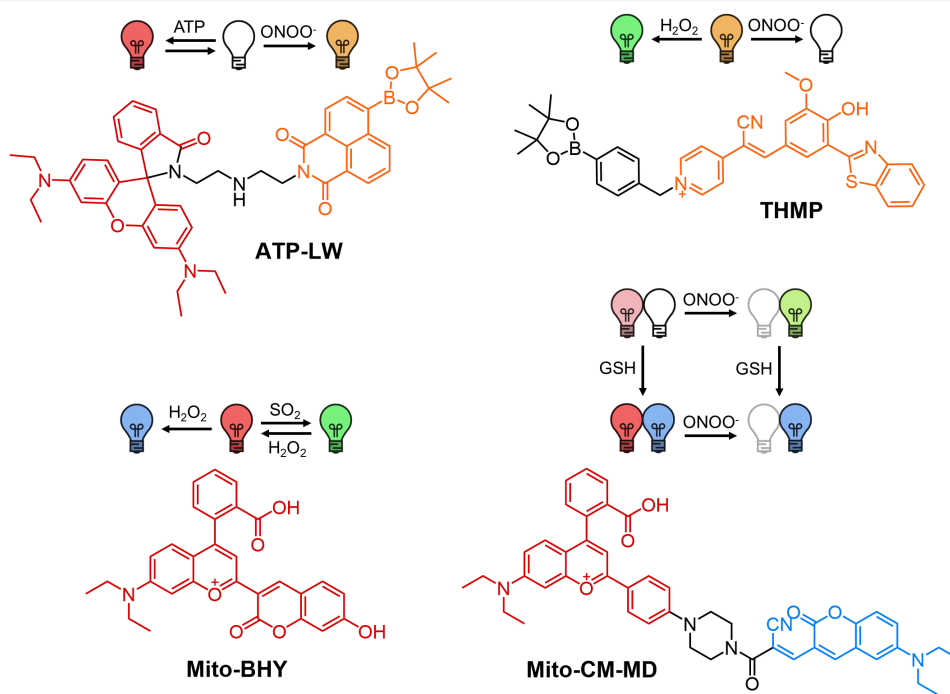


Rycina 14. Struktury sond nieodwracalnych wraz z wykrywanymi analitami. Wyszczególnione kolorem elementy cząsteczek przedstawiają ich część odpowiedzialną za emisję wraz z potencjalnym kolorem fluorescencji. Symbole żarówek przedstawiają kolory emisji w odpowiedzi na wybrany analit, podczas gdy żarówka biała oznacza cząsteczkę nieaktywną (brak emisji). Jasnoniebieski kolor żarówki przedstawia małą intensywność emisji niebieskiej, różowy zaś emisji czerwonej, azo - azoreduktaza; MAO-A - oksydaza monoaminowa A; β -gal - β -galaktozydaza.

Wykrywanie analitów przez sondę CS obejmuje utlenianie i oddzielenie grupy DMTC przez HClO, co prowadzi do zmian fluorescencji w różnych warunkach pH, które wykazują maksimum emisji fluorescencji tylko w niskim pH (przypadek odpowiedzi typu turn-on dla środowiska kwasowego). ANET to wrażliwa na pH sonda ukierunkowana na mitochondria [61]. Została ona wykorzystana do specyficznego obrazowania aktywności oksydazy monoaminowej A (MAO-A) w kilku liniach komórkowych. Tryb wykrywania ANET opiera się na modulowaniu efektu wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia ładunku (ICT). Fenolowe grupy hydroksylowe produktu otrzymanego po uwolnieniu cząsteczki propyloaminy są deprotonowane w alkalicznym środowisku mitochondriów, wzmacniając efekt ICT. W ten sposób sonda wykazuje odpowiedź fluorescencyjną przy 700 nm w obecności MAO-A w mitochondriach. Chen i in. zaprojektowali czułą na pH sondę fluorescencyjną MLC do wykrywania i obrazowania β -galaktozydazy (β -gal) w lizosomach [66]. Jej cząsteczka składa się z miejsca rozpoznawania β -gal, które jednocześnie wygasa emisję fluoroforu, pochodnej naftalimidu (w procesie PeT). Hydrolyza wiązania glikozydowego przez β -gal uwalnia uprotonowaną formę MLC, tj. MLC-OH (ze względu na kwasowe pH lizosomalne). MLC-OH wykazuje zwiększoną emisję fluorescencji z powodu zablokowania zjawiska wygaszania fluorescencji na bazie mechanizmu PeT. RTFt1 został zaproponowany do jednoczesnego wykrywania zarówno Fe^{2+} , jak i H_2O_2 , które, jak się uważa, przyczyniają się do uszkodzeń i śmierci komórek zależnych od reaktywnych form tlenu [74, 75]. Działanie tej sondy opiera się na chelatacji jonu Fe^{2+} poprzez otwartą formę pierścienia spiro-laktamowego w pierwszym etapie odpowiedzi. Pierścień ten może przyjmować otwartą formę zarówno przez efekt działania grup hydrazydowych, jak i tiolowych. Drugi etap reakcji obejmuje

je hydrolyzę wiązania amidowego *in situ* w obecności H_2O_2 , która wytwarza OH^- i $\cdot OH$, a także uwalnia fluorescencyjną rodaminę B, wykazującą maksymalną intensywność fluorescencji (200-krotny wzrost) w porównaniu do wyjściowej formy sondy (niechelatowanej i/lub chelatowanej). Warto zaznaczyć, że istnieje możliwość interferencji z kwasem podchlorynowym, dlatego weryfikacja selektywności wymagałaby także dodatkowych testów w obecności ClO^- . Jeśli mowa o sensorach ClO^- , opracowano zestaw sond, które zostały niedawno opublikowane przez Chen i in., umożliwiających sekwencyjne wykrywanie HS^- i ClO^- zarówno w komórkach, jak i w organizmach myszy [76]. Reaktywność na HS^- i ClO^- opiera się w nich odpowiednio na substytucji nukleofilowej i reakcji tworzenia pierścienia tiofuranowego.

Dwie ciekawe sondy do wykrywania adenosynotrifosforanu (ATP) i innych specyficznych związków chemicznych to sonda Fang i in. [77] oraz sonda ATP-LW Wu, L. i in. [78]. Cząsteczka otrzymana przez Fang i in. umożliwia jednoczesne wykrywanie NTR (nitroreduktazy) i ATP, co pozwoliło dojść do wniosku, że wewnątrzkomórkowe NTR i ATP wykazują niekorzystny trend zmian podczas procesu niedotlenienia i dodatkowo ATP może służyć jako nowy wskaźnik niewystarczającej ilości tlenu w komórkach. Ta dwuanalitowa sonda składa się z dwóch reaktywnych części, które są wzbudzone przy dwóch różnych długościach fal: 4-hydroksy-1,8-naftalimidu ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 568 \text{ nm}$) i pierścienia rodaminy ($\lambda_{ex} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 587 \text{ nm}$) odpowiednio do wykrywania NTR i ATP. W obecności NTR, pochodna naftalimidu wykazuje zwiększoną emisję fluorescencji; z drugiej strony, obecność samego ATP powoduje otwarcie pierścienia rodaminy i emisję fluorescencji. Jing i in. przedstawili sondę Mito-CM-CD do jednoczesnego wykrywania GSH i ONOO⁻ o ulepszonej czułości i selektywności w porównaniu z analogicznymi sondami opublikowa-



Rycina 15. Struktury sond nieodwracalnych wraz z wykrywanymi analitami. Wyszczególnione kolorem elementy cząsteczek przedstawiają ich część odpowiedzialną za emisję wraz z potencjalnym kolorem fluorescencji. Symbole żarówek przedstawiają kolory emisji w odpowiedzi na wybrany analit, żarówka biała oznacza cząsteczkę nieaktywną (brak emisji), żarówka szara eliminację danej części struktury w odpowiedzi na analit. Różowy kolor żarówki przedstawia małą intensywność emisji czerwonej. ATP - adenosyno-5'-trifosforan; GSH - glutation.

nymi wcześniej [62]. Oddzielne wykrywanie GSH i ONOO⁻ w fizjologicznym pH uzyskuje się dzięki podwójnej długości fali wzbudzenia i podwójnej długości fali emisji. Długości jej fali wzbudzenia wynoszą odpowiednio 410 nm i 500 nm. Co więcej, jednoczesne wykrywanie mitochondrialnego GSH i ONOO⁻ jest możliwe dzięki zintegrowanemu mechanizmowi ICT-FRET. ONOO⁻ został również wykryty wraz z H₂O₂ przez sondę THMP [79]. Sonda ta jest szczególnie interesująca, ponieważ wykorzystano różną reaktywność zastosowanych w sensorach boronianów wobec wybranych cząsteczek sygnałowych. THMP została zaprojektowana w sposób umożliwiający selektywną utleniającą dysocjację wiązania, uwalniając dwa różne fluorofory w zależności od analitu, gdzie oba z nich wykazują emisję fluorescencji przy dwóch różnych długościach fali. Jednoczesne wykrywanie H₂O₂ i SO₂ zostało przeprowadzone z użyciem sond zarówno bez ukierunkowania na organelle (BI oraz BBI [80]), jak i z ukierunkowaniem na mitochondria (DCA-Bba [81] oraz Mito-BHY [82]). Ostatnia z nich jest szczególnie interesująca, ponieważ wykazuje trzy różne emisje fluorescencji (niebieską, zieloną i czerwoną) w zależności od otrzymanej w wyniku interakcji z analitem struktury. Emisja czerwona jest wynikiem wzbudzenia niezmiennego rozszerzonego układu π-sprzężonego Mito-BHY, zielona przez przerwany układ π-sprzężony w wyniku odwracalnej reakcji z SO₂, a niebieska po nieodwracalnej reakcji z H₂O₂. Wybrane sondy z tego rozdziału zostały przedstawione na rycinie 15.

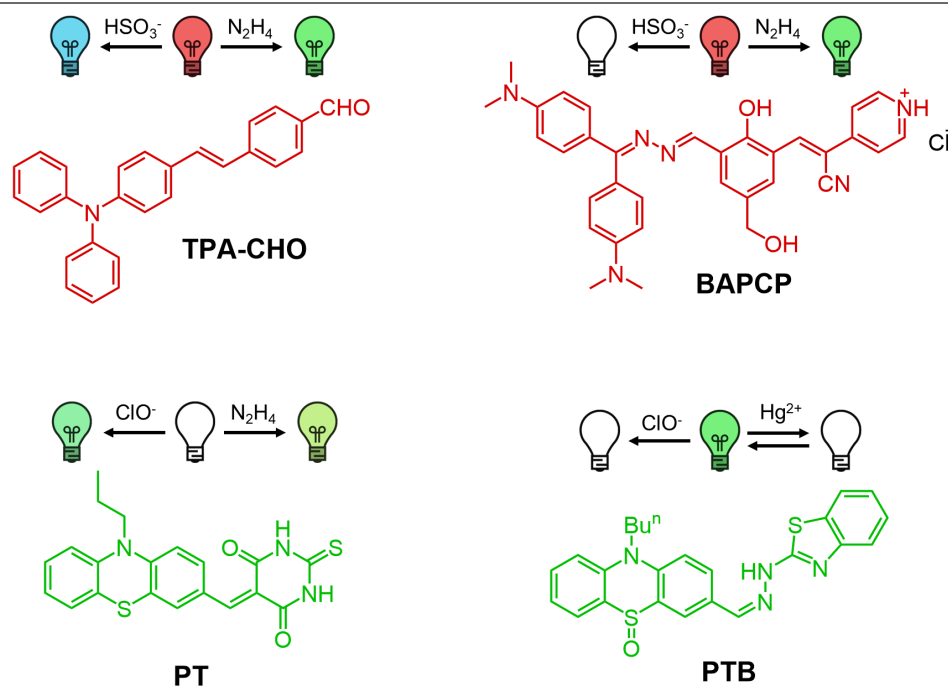
W niektórych przypadkach niezwykle ważne jest wykrywanie związków chemicznych szkodliwych dla organizmów żywych. Przykłady takich sond zostały przedstawione na rycinie 16. W odniesieniu do tego aspektu opracowano kilka dwuanalitowych cząsteczek do wykrywania hydrazyny lub metalu ciężkiego oraz konkretnego anionu. Hydrazyna (N₂H₄) i wodorosiarczyny (HSO₃⁻) są rozpoznawane przez sondy TPA-CHO [83] i BAPCP [84]. Pierwsza z nich wykazuje

emisję fluorescencji przy dwóch różnych długościach fali, gdy reaguje z którymkolwiek z analitów, a druga wykazuje zmianę stosunku intensywności fluorescencji w dwóch różnych długościach fali (tzw. reakcję „różnicową”) NIR dla hydrazyny i zanik emisji dla HSO₃⁻. Hydrazyna i ClO⁻ są także wykrywane w komórkach za pomocą sondy PT [85]. Z kolei kation metalu ciężkiego Hg²⁺ i anion ClO⁻ były monitorowane w komórkach za pomocą cząsteczki PTB poprzez tworzenie stabilnego kompleksu z jonem metalu w stosunku koordynacji 2:1 i nieodwracalną reakcją z ClO⁻ [86].

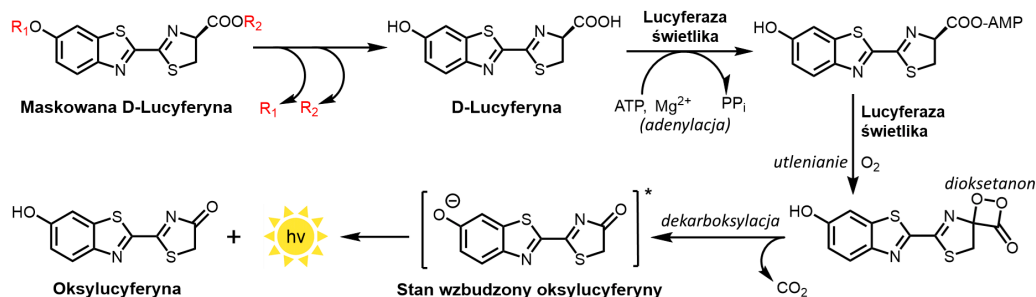
DWUANALITOWE SONDY BIOLUMINESCENCYJNE

Obrazowanie bioluminescencyjne i analityczne testy bioluminescencyjne to nieinwazyjne i czułe techniki szeroko stosowane w badaniu procesów biologicznych *in vitro* oraz *in vivo*. Zjawisko bioluminescencji to proces generowania światła (fotonów) w wyniku enzymatycznej reakcji utleniania substratu (lucyferyny) pod wpływem enzymów zwanych lucyferazami. Pozwala ono na prostą ilościową ocenę sygnału, który jest zależny przede wszystkim od stężenia enzymu i substratów. Bioluminescencja występuje naturalnie w szeregu organizmów, w tym m.in. glonach, meduzach czy owadach. Trzy najczęściej stosowane lucyferazy w badaniach biologicznych to lucyferaza świetlika (Fluc, której naturalnym substratem jest D-lucyferyna), lucyferaza *Renilla* (Rluc z koelenterazyną jako substratem) i NanoLuc (laboratoryjnie zoptymalizowana i zminiaturyzowana lucyferaza Nluc z furymazyńą i pochodnymi jako substratami) [5,87,88].

Do kluczowych zalet bioluminescencji należą wysoka czułość i biokompatybilność. Umożliwia to badaczom monitorowanie subtelnych zmian aktywności biologicznej *in cellulo* i *in vivo*, zapewniając cenny wgląd w podstawowe procesy biologiczne. Zjawisko bioluminescencji nie występuje naturalnie w komórkach ssaczych, w przeciwieństwie



Rycina 16. Struktury wybranych nieodwracalnych sond wraz z wykrywanymi analitami. Wyszczególnione kolorem elementy cząsteczek przedstawiają ich część odpowiedzialną za emisję wraz z potencjalnym kolorem fluorescencji. Symbole żarówek przedstawiają kolory emisji w odpowiedzi na wybrany analit, żarówka biała oznacza cząsteczkę nieaktywną (brak emisji).



Rycina 17. Mechanizm bioluminescencji D-lucyferyny. Opis procesu przedstawiony został w tekście.

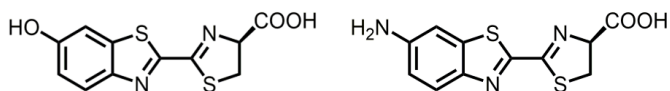
do szeregu endogennych fluoroforów odpowiedzialnych za autofluorescencję (jak np. reszty aminokwasów czy DNA, a także kofaktorów enzymatycznych i witamin opartych o nikotynamid, flawiny czy też retinol – w praktyce autofluorescencja komórkowa, za wyjątkiem wyspecjalizowanych typów komórek, jak np. melanocyty, pojawia się w pomiarach wykorzystujących fale wzbudzenia krótsze niż 480 nm – 500 nm). Dzięki temu sygnał bioluminescencyjny zazwyczaj charakteryzuje się wyższym stosunkiem sygnału do szumu niż sygnał fluorescencyjny. Co więcej, bioluminescencja nie wymaga wzbudzenia zewnętrznym źródłem światła (gdyż powstaje w wyniku reakcji enzymatycznej). Zmniejsza to potencjalną fototoksyczność i pozwala na detekcję sygnałów w bardziej złożonych próbkach (w tym *in vivo*), a także obserwację sygnału przez dłuższy czas niż fluorescencja, bez uszkodzania komórek. Obrazowanie bioluminescencyjne jest przez to również odpowiednią techniką do obrazowania komórek wrażliwych na światło [5,89]. Ma ono jednak kilka ograniczeń, m.in. wymaga użycia transgenicznnych linii komórkowych lub modeli zwierzęcych z ekspresją enzymu lucyferazy albo zewnętrznego dostarczenia enzymu do układu. Ze względu na udział tlenu w procesie utleniania substratu i tym samym generowania sygnału bioluminescencyjnego, jego poziom może wpływać na poziom sygnału, utrudniając interpretację. Co więcej, uniemożliwia to wykorzystanie bioluminescencji w układach z bardzo niskim stężeniem (lub brakiem) tlenu (np. mikroorganizmach beztlenowych). W przeciwieństwie do obrazowania fluorescencyjnego, brak zewnętrznego wzbudzenia, a zatem kontroli miejsca, w którym sygnał jest emitowany, powoduje znacznie mniejszą rozdzielczość przestrzenną. Z uwagi na fakt, że bioluminescencja jest generowana tylko tak długo, jak dostępny pozostaje substrat, może to utrudniać długotrwałe obrazowanie (w przeciwieństwie do fluorescencji, którą można wzbudzać i mierzyć także po ustaniu reakcji enzymatycznej, pod warunkiem stabilności powstającego produktu).

Intensywne badania z ostatnich lat nad powiększeniem wachlarza dostępnych substratów bioluminescencyjnych [90] doprowadziły m.in. do opracowania par lucyferyna-lucyferaza emitujących światło przesunięte ku czerwieni (a zatem bardziej przenikalne przez tkanki i biokompatybilne) oraz przede wszystkim maskowanych lucyferyn, które działają jak sondy responsywne. Te narzędzia stworzyły zupełnie nowe możliwości wykorzystania bioluminescencji do wykrywania (podobnie jak sondy fluorescencyjne) wielu celów molekularnych, w tym enzymów, związków ma-

locząsteczkowych, a nawet substancji nieorganicznych jak jony metali czy wolne rodniki [87,90].

Substraty bioluminescencyjne można przekształcić w sondy do wykrywania aktywności (ang. *activity-based sensing*, ABS) różnych analitów. Sondy ABS wykorzystują strategię maskowania, w której lucyferyny są blokowane poprzez przyłączenie grupy reaktywnej wrażliwej na docelowy analit (np. enzym lub małą cząsteczkę). W tym „maskowanym” stanie grupa reaktywna utrudnia interakcję między lucyferyną a lucyferazą, zapobiegając emisji światła. Grupy te mogą być przyłączone w pozycji 6'-OH lub 6'-NH₂ odpowiednio dla D-lucyferyny lub D-aminolucyferyny oraz w pozycji 4-COOH dla obu z pochodnych lucyferyny. Gdy docelowy analit wchodzi w interakcję z grupą reaktywną i rozszczepia ją, tworzona jest wolna lucyferyna (Ryc. 17) [91]. Powstała cząsteczka przechodzi serię reakcji enzymatycznych, w tym adenylację i utlenianie, w wyniku czego powstaje krótkotrwały, czterocząłkowy cykliczny półprodukt dioksetanonu. Ten związek pośredni ulega następnie dekarboksylacji, prowadząc do powstania oksylucyferyny w stanie wzbudzonym. Gdy ten stan wzbudzony relaksuje się z powrotem do stanu podstawowego, emituje foton, wytwarzając sygnał w postaci luminescencji. Intensywność tego sygnału jest proporcjonalna do ilości odblokowanej wcześniej maskowanej grupy, a zatem służy jako funkcjonalny wskaźnik aktywności docelowego analitu [92].

Obecnie w literaturze opisano jedynie kilka dwuanalitycznych sond bioluminescencyjnych. Wszystkie one jak dotąd opierają się na systemie lucyferazy Fluc świetlika *Photinus pyralis*, który pozostaje wciąż najbardziej rozpowszechnionym w zastosowaniach bioanalitycznych. Lucyferaza świetlika (Fluc) to białko o masie 61 kDa, które historycznie zdominowało dziedzinę obrazowania bioluminescencyjnego *in vivo* ze względu na wyjątkową zdolność penetracji tkanek w połączeniu z jej specyficznym substratem, D-lucyferyną (Ryc. 18). Enzym ten został wyizolowany z północnoamerykańskiego świetlika *P. pyralis* i jest jednym z pierwszych tego typu systemów, które zostały opisane i scharakteryzowane. Bioluminescencja D-lucyferyny wymaga aktywacji przez ATP przed utlenieniem i jonów Mg²⁺ jako kofaktora. Warto podkreślić, że D-lucyferyna charakteryzuje się lepszą rozpuszczalnością w wodzie i niższą toksycznością niż inne lucyferyny, takie jak koelenterazyna, substrat dla lucyferazy *Renilla*. Co więcej, D-lucyferyna wykazuje najwyższą wydajność kwantową i najdłuższą falę emisji ($\lambda_{\text{max}} = 560$ nm) spośród znanych par lucyferyna/lucyferaza, co czyni ją idealną do obrazowania przykładowo krwi ze względu na



Rycina 18. Struktury dwóch możliwych substratów dla lucyferazy świetlika Fluc: D-lucyferyny (po lewej) oraz D-aminolucyferyny (po prawej).

zmniejszoną absorpcję przez hemoglobinę i tkanki ($\lambda < 500$ nm). D-aminolucyferyna (Ryc. 18), syntetyczny analog D-lucyferyny, również może być stosowana do obrazowania bioluminescencyjnego z Fluc i ma bardziej przesuniętą ku czerwieni emisję w porównaniu do D-lucyferyny ($\lambda_{\text{max}} = 600$ nm), co czyni ją lepszą do zastosowań *in vivo* [5,93,94].

Istnieją dwie główne strategie, które można wykorzystać do opracowania dwuanalitowych sond kompatybilnych z systemem Fluc (Ryc. 19): (i) poprzez przyłączenie dwóch grup maskujących do substratu (D-aminolucyferyny lub D-lucyferyny) [95]; (ii) poprzez zastosowanie metody „rozszczonej lucyferyny”, w której D-aminolucyferyna lub D-lucyferyna powstaje *in situ* w reakcji pochodnej 2-cyjanobenzotiazolu oraz D-cysteiny (D-Cys) w fizjologicznym pH, po odłączeniu obu grup maskujących [96].

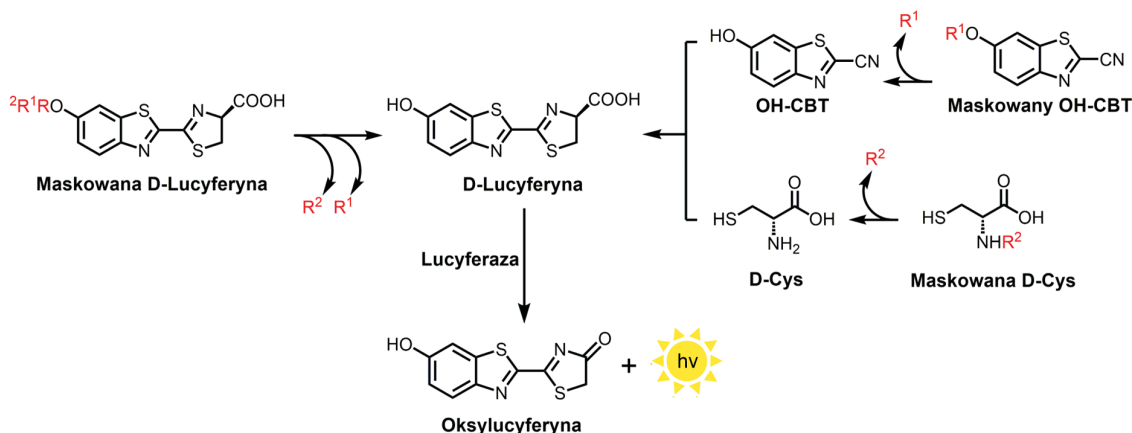
PODWÓJNIE MASKOWANE SUBSTRATY BIOLUMINESCENCYJNE

Poniżej podano dwa przykłady, które wykorzystują pojęcie dwuanalitowego wykrywania poprzez wykorzystanie pojedynczej cząsteczki D-aminolucyferyny.

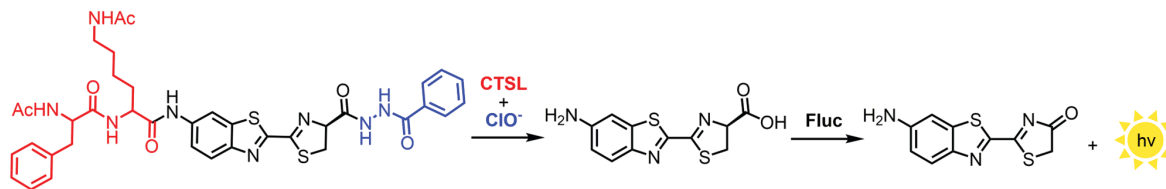
Niedawno opublikowana sonda bioluminescencyjna FK-Luc-BH jest sondą dwuanalitową do jednoczesnego wykrywania katepsyny L (CTSL) i podchlorynu (ClO^-) [95]. Zarówno poziom CTSL, jak i ClO^- są znacznie podwyższone we wczesnym stadium nowotworów złośliwych. Dzięki zastosowaniu maskowania, zaprojektowano precyzyjną sondę działającą na zasadzie bramki logicznej typu AND do obrazowania guzów. Grupa aminowa D-aminolucyferyny została zablokowana elementem stanowiącym substrat FK rozpoznawany przez CTSL, a grupę karboksylową zamaskowano motywem reaktywnym wobec ClO^- , benzoilohydrazyną (Ryc. 20). Eksperymenty *in vitro* wykazały, że FK-Luc-BH skutecznie przekształca się w wolną

D-aminolucyferynę po inkubacji z CTSL i ClO^- , co skutkuje intensywnym sygnałem bioluminescencyjnym po reakcji katalitycznej z udziałem FLuc. Selektywność FK-Luc-BH wobec CTSL i ClO^- została potwierdzona poprzez monitorowanie odpowiedzi bioluminescencyjnej sondy na różne indywidualne biochemiczne w roztworze. Eksperymenty na komórkach i zwierzętach wykazały, że jednoczesna odpowiedź na CTSL i ClO^- znacznie zwiększyła wiarygodność i intensywność światła wytwarzanego przez sondę w komórkach 4T1-fLuc lub miejscach guza 4T1-fLuc, w porównaniu do niereagującego związku kontrolnego Ac-Luc-EA. Dodatkowo, zaobserwowano znacznie niższy sygnał bioluminescencyjny w komórkach 4T1-fLuc traktowanych jednocześnie FK-Luc-BH i zmiataczem ClO^- (tauryną) lub inhibitorem katepsyny E-64d o szerokim spektrum działania, co wskazuje na wysoką specyficzność i dokładność obrazowania guza. Ta platforma typu AND może być modyfikowana poprzez zastąpienie grup maskujących D-aminolucyferynę (tj. FK i benzoilohydrazyny w tym badaniu) innymi grupami, dzięki czemu można ją zastosować do obrazowania innych chorób również w sposób dwuanalitowy.

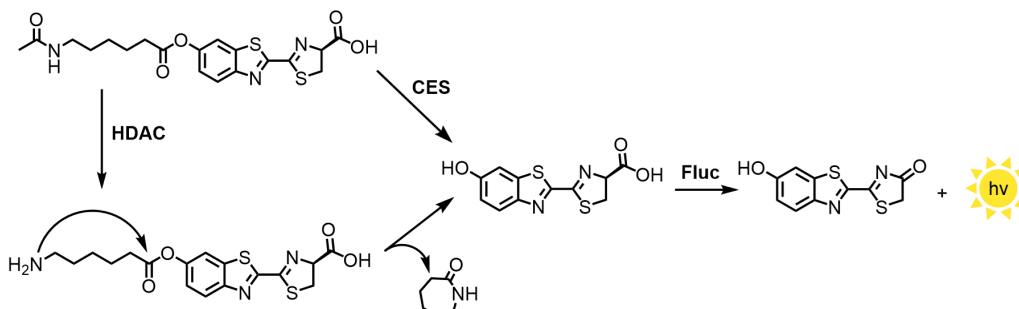
Drugim przykładem podwójnie maskowanej lucyferyny jest sonda bioluminescencyjna AcAH-Luc do jednoczesnego wykrywania karboksyoesterazy (CES) i deacetylasy histonowej (HDAC) (Ryc. 21). Oba te enzymy ulegają nadekspresji w nowotworach złośliwych. AcAH-Luc okazała się skuteczna *in vitro* w wykrywaniu CES i HDAC6, specyficznego typu HDAC. Eksperymenty komórkowe wykazały, że bioluminescencja AcAH-Luc w komórkach MDA-MB-231 była głównie spowodowana aktywnością CES i HDAC, z których każda posiadała niemal równy udział przy wzmacnianiu sygnału. Wyniki eksperymentów *in vivo* wskazują, że około połowa i jedna trzecia sygnału bioluminescencyjnego AcAH-Luc była spowodowana odpowiednio aktywnością CES i HDAC w nowotworach. Autorzy sugerują, że AcAH-Luc może być potencjalnie wykorzystywany do pomiaru i obrazowania aktywności CES i HDAC w przyszłości, co może pomóc w precyzyjnej diagnostyce nowotworów złośliwych [97]. Należy jednak podkreślić, że częściowa aktywacja pojedynczym enzymem może powodować trudności interpretacyjne w przypadku wzrostu sygnału, gdyż jego przyczyną może być zarówno obecność obu enzymów, jak i większe stężenie jednego z nich.



Rycina 19. Strategie opracowywania sond z dwoma analitami dla obrazowania bioluminescencyjnego opartego na Fluc. Po lewej: maskowanie D-lucyferyny dwoma grupami maskującymi. Po prawej: wykorzystanie reakcji rozszczepienia lucyferyny poprzez maskowanie dwóch specyficznych fragmentów, które tworzą D-lucyferynę *in situ* po usunięciu grup maskujących. D-Cys - D-cysteina; OH-CBT - hydroksycyjanobenzotiazol.



Rycina 20. Mechanizm działania sondy FK-Luc-BH. Części responsywne wobec CTSL i ClO⁻ zaznaczone są odpowiednio na czerwono i niebiesko. CTSL – katepsyna L. Na podstawie [95].



Rycina 21. Mechanizm działania sondy AcAH-Luc. CES – karboksylolizaza; HDAC – deacetylaza histonowa. Na podstawie [97].

STRATEGIA ROZSZCZEPIONEJ LUCYFERYNY

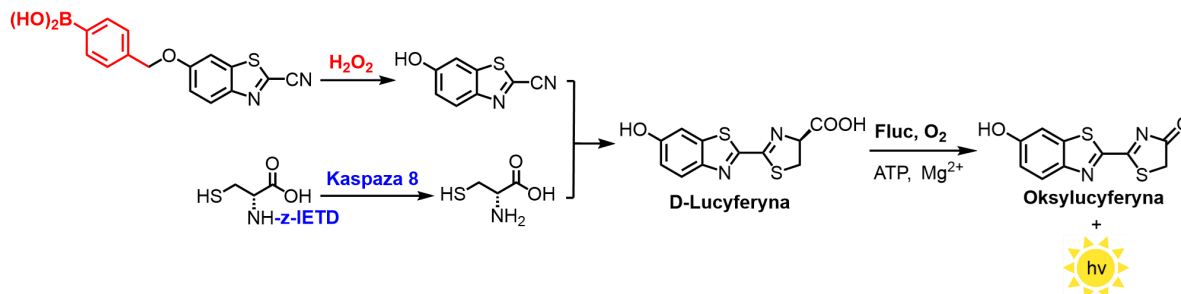
Drugie podejście do dwuanalitowej detekcji obejmuje metodę rozszczepionej na dwa elementy lucyferyny. Metoda ta wykorzystuje dwa fragmenty substratu bioluminescencyjnego, które nie wytwarzają sygnału bioluminescencyjnego, a mianowicie pochodną D-cysteiny (D-Cys-X) i hydroksy/amino-cyjanobenzotiazol (HO-CBT/H₂N-CBT). HO-CBT/H₂N-CBT nie posiada kluczowej grupy karboksylowej niezbędnej do rozpoznania przez enzym lucyferazę, podczas gdy D-Cys posiada brakującą grupę karboksylową, ale nie posiada pozostałych elementów strukturalnych lucyferyny. Oba te fragmenty są maskowane i niezależnie dostarczane do miejsca docelowego. Co więcej, pozostają one biologicznie nieaktywne, dopóki nie pojawi się określony docelowy analit. Czynnikiem wyzwajającym może być enzym lub biomolekuła, która hydrolizuje obie grupy maskujące, uwalniając zarówno wolny fragment D-Cys, jak i CBT. Po odblokowaniu, fragment D-Cys ulega selektywnej i bioortogonalnej reakcji w fizjologicznym pH z fragmentem HO-CBT/H₂N-CBT, w wyniku czego powstaje funkcjonalna D-aminolucyferyna. Ta nowo utworzona lucyferyna może być następnie rozpoznana i wykorzystana przez lucyferazę do generowania bioluminescencji. Intensywność emitowanego światła jest proporcjonalna do ilości utworzonej lucyferyny, odzwierciedlając aktywność elementów wyzwajających reakcję połączenia obu fragmentów. Z uwagi na fakt, że obie części lucyferyny muszą być aktywowane, aby doszło do odtworzenia substratu, sygnał bioluminescencyjny powstaje jedynie w przypadku obecności obu celów molekularnych. Pozwala to na bardziej wiarygodne potwierdzenie współwystępowania obu analitów. Metoda ta została opisana w 2013 r. przez Van de Bittnera i in. dla podwójnego wykrywania H₂O₂ i kaspazy 8. Okazała się ona skuteczna dla eksperymentów *in vitro*, *in cellulo* oraz *in vivo* (Ryc. 22) [96]. W tym przypadku, HO-CBT jest maskowany pochodną kwasu 4-(metylo)fenyloboronowego reagującą na nadtlenuk wodoru, która to część po wykryciu analitu ulega eliminacji. D-Cys jest zablokowany sekwencją tetra-

peptydową (z-IETD) rozpoznawaną przez kaspazę 8, który to enzym hydrolizuje wiązanie amidowe między D-Cys a ostatnim aminokwasem sekwencji tetrapeptydowej, uwalniając cząsteczkę D-Cys. Gdy oba te fragmenty zostaną uwolnione, reagują, tworząc D-lucyferynę, która może następnie dalej wejść w interakcję z lucyferazą, dając w rezultacie sygnał bioluminescencyjny.

W porównaniu z tradycyjnymi metodami obrazowania bioluminescencyjnego, podejście oparte na rozszczepionej lucyferynie zapewnia lepszą redukcję tła. Jest to możliwe dzięki temu, że fragmenty lucyferyny są nieaktywne do momentu napotkania obu analitów, co minimalizuje luminescencję tła wynikającą z niespecyficznego uwalniania lucyferyny. Prowadzi to do wyższego stosunku sygnału do szumu, zwiększając czułość i specyficzność techniki obrazowania [96]. Wykorzystanie dwóch oddzielnych fragmentów, każdy blokowany indywidualnie, przypomina jednak bardziej zastosowanie dwóch jednoanalitowych sond fluorescencyjnych, a zatem może się wiązać z ograniczeniami wynikającymi z różnej lokalizacji i metabolizmu każdej z części.

PODSUMOWANIE

Sondy luminescencyjne cieszą się ogromnym zainteresowaniem społeczności naukowej już od kilku dekad. Zapewniają one wyjątkową możliwość przyjrzenia się zaawansowanym procesom wewnątrzkomórkowym z rosnącą rozdzielczością i wiarygodnością. W celu lepszego zrozumienia złożonych zależności różnych elementów komórkowych w procesach fizjologicznych i patologicznych, od kilku lat znacznie zintensyfikowano badania nad opracowaniem i wykorzystaniem tzw. sond wieloanalitowych, pozwalających na śledzenie więcej niż jednego celu molekularnego/parametru mikrośrodowiska jednocześnie. Ten artykuł ma na celu przybliżenie czytelnikom tych nowych, wiarygodnych i obiecujących narzędzi.



Rycina 22. Dwuanalitowa detekcja przy użyciu rozszczepionej lucyferyny do wykrywania nadtlenu wodoru i kaspazy 8. Z-IETD – sekwencja tetrapeptydowa rozpoznawana przez kaspazę 8. Na podstawie [96].

Skuteczność w projektowaniu dwu- oraz trójanalitowych sond niewątpliwie oferuje unikalną perspektywę bardziej kompleksowego badania procesów molekularnych. Należy jednak zdawać sobie sprawę ze złożoności zadania, wynikającej ze zwielokrotnienia liczby docelowych analitów lub zmian w mikrośrodowisku. Jak dotąd opublikowano kilka artykułów przeglądowych podsumowujących temat projektowania sond responsywnych, szczegółowo omawiających niuanse tego procesu [6,7,98]. Co więcej, wachlarz dostępnych luminoforów rośnie z każdym rokiem, dając możliwość tworzenia bibliotek związków obejmujących widzialną część widma i podczerwień. Z uwagi na fakt, iż większość procesów zachodzących w pojedynczych komórkach wymaga obecności wielu analitów, wykorzystanie sond wieloanalitowych będzie dalej dynamicznie rosło. To pozwoli nie tylko na lepsze zrozumienie procesów chorobowych, ale też wesprzeć dynamiczny rozwój koncepcji medycyny precyzyjnej (spersonalizowanej).

PIŚMIENNICTWO:

- Qi YL, Chen LL, Guo L, Cao YY, Wang HR, Yang YS, Lu YD, Zhu HL (2020) Multifunctional fluorescent probes "killing two birds with one stone" – recent progress and outlook. *Appl Mater Today* 21:100877
- Wang S, Zhao X, Liu M, Yang L, Yu M, Li Z (2023) A dual-responsive crimson fluorescent probe for real-time diagnosis of alcoholic acute liver injury. *Biosens Bioelectron* 239(May):115596
- Ito Y, Dötsch V, Shirakawa M (2019) In-cell NMR spectroscopy: From molecular sciences to cell biology (New developments in NMR). Royal Society of Chemistry; 1st edition
- Fu Y, Finney NS (2018) Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Adv* 8(51):29051–29061
- Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV (2016) 1001 lights: Luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chem Soc Rev* 45(21):6048–6077
- Kolanowski JL, Liu F, New EJ (2018) Fluorescent probes for the simultaneous detection of multiple analytes in biology. *Chem Soc Rev* 47(1):195–208
- Jun J V., Chenoweth DM, Petersson EJ (2020) Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications. *Org Biomol Chem* 18(30):5747–5763
- Wang L, Tran M, D'Este E, Roberti J, Koch B, Xue L, Johnsson K (2020) A general strategy to develop cell permeable and fluorogenic probes for multicolour nanoscopy. *Nat Chem* 12(2):165–172
- Yue Y, Huo F, Cheng F, Zhu X, Mafireyi T, Strongin RM, Yin C (2019) Functional synthetic probes for selective targeting and multi-analyte detection and imaging. *Chem Soc Rev* 48(15):4155–4177
- Han ZX, Xiong J, Ren TB, Zhang XB (2022) Recent advances in dual-target-activated fluorescent probes for biosensing and bioimaging. *Chem – An Asian J* 17(14):1–15
- Guo J, Fang B, Bai H, Wang L, Peng B, Qin XJ, Fu L, Yao C, Li L, Huang W (2022) Dual/Multi-responsive fluorogenic probes for multiple analytes in mitochondria: From design to applications. *TrAC – Trends Anal Chem* 155:1–23
- Ma Y, Yin J, Li G, Gao W, Lin W (2020) Simultaneous sensing of nucleic acid and associated cellular components with organic fluorescent chemosensors. *Coord Chem Rev* 406:213144
- Dey N, Bhattacharya S (2020) Switchable optical probes for simultaneous targeting of multiple anions. *Chem – An Asian J* 15(12):1759–1779
- Liu T, Liu X, Spring DR, Qian X, Cui J, Xu Z (2014) Quantitatively mapping cellular viscosity with detailed organelle information via a designed PET fluorescent probe. *Sci Rep* 4:1–7
- Wang K, Sun XH, Zhang Y, et al (2019) Characterization of cytoplasmic viscosity of hundreds of single tumour cells based on micropipette aspiration. *R Soc Open Sci* 6(3):181707
- Klymchenko AS (2017) Solvatochromic and fluorogenic dyes as environment-sensitive probes: design and biological applications. *Acc Chem Res* 50(2):366–375
- Pivovarenko VG, Klymchenko AS (2024) Fluorescent probes based on charge and proton transfer for probing biomolecular environment. *Chem Rec* 24(2):1–29
- Kashirina AS, López-Duarte I, Kubánková M, Gulín AA, Dudenkova V V., Rodimova SA, Torgomyan HG, Zagaynova E V., Meleshina A V., Kuimova MK (2020) Monitoring membrane viscosity in differentiating stem cells using BODIPY-based molecular rotors and FLIM. *Sci Rep* 10(1):1–12
- Kubánková M, Summers PA, López-Duarte I, Kiryushko D, Kuimova MK (2019) Microscopic viscosity of neuronal plasma membranes measured using fluorescent molecular rotors: effects of oxidative stress and neuroprotection. *ACS Appl Mater Interfaces* 11(40):36307–36315
- Mukherjee T, Soppina V, Ludovic R, Mély Y, Klymchenko AS, Collot M, Kanvah S (2021) Live-cell imaging of the nucleolus and mapping mitochondrial viscosity with a dual function fluorescent probe. *Org Biomol Chem* 19(15):3389–3395
- Silswal A, Kanojiya A, Koner AL (2022) A fluorogenic far red-emitting molecular viscometer for ascertaining lysosomal stress in live cells and *Caenorhabditis elegans*. *Front Chem* 10(March):1–9
- Li H, Shi W, Li X, Hu Y, Fang Y, Ma H (2019) Ferroptosis accompanied by •OH generation and cytoplasmic viscosity increase revealed via dual-functional fluorescence probe. *J Am Chem Soc* 141(45):18301–18307
- Zhang J, Gong S, Liu Y, Zheng Z, Feng G (2024) Simultaneous detection of peroxynitrite and viscosity in diabetes by a dual response fluorescent probe. *Sensors Actuators B Chem* 406(January):135432
- Zhang X, Yan H, Huo F, Chao J, Yin C (2021) Dual-emission NIR fluorescent probe sensitive response biological microenvironment and sulfur dioxide. *Sensors Actuators, B Chem* 344(June):130244
- Wang LL, Xu Q, Xie YZ, Zhang YR, Zheng MH, Li XF, Jin JY (2024) A triple-targeting fluorescent probe reveals the glutathione and viscosity crosstalk in mitochondria, endoplasmic reticulum, and nucleoli in cells during ferroptosis. *Sensors Actuators B Chem* 399(July 2023):134872

26. Du W, Wang J, Fang H, et al (2022) Mitochondria-specific two-photon fluorogenic probe for simultaneously visualizing nitroreductase and viscosity in cancer cells. *Sensors Actuators B Chem* 370(July):132456
27. Zhan J, Geng C, Hao X, Song W, Li Z, Lin W (2022) A pH-correctable, viscosity-susceptible fluorescent reporter for organellar sulfur dioxide. *Sensors Actuators B Chem* 371(July):132506
28. Zheng YL, Li XC, Tang W, Xie L, Dai F, Zhou B (2022) A coumarin-based fluorescent probe: Small but multi-signal. *Sensors Actuators B Chem* 368(June):132169
29. Chai L, Li Y, Yang H, Wang Y, Huang R, Wei Z, Zhan Z (2023) pH-triggered fluorescent probe for sensing of hypochlorite and viscosity in live cells and chronic wound diabetic mice. *Sensors Actuators B Chem* 393(May):134345
30. Xiao H, Li P, Tang B (2021) Recent progresses in fluorescent probes for detection of polarity. *Coord Chem Rev* 427:213582
31. Collot M, Fam TK, Ashokkumar P, Faklaris O, Galli T, Danglot L, Klymchenko AS (2018) Ultrabright and fluorogenic probes for multi-color imaging and tracking of lipid droplets in cells and tissues. *J Am Chem Soc* 140(16):5401-5411
32. Danylchuk D, Moon S, Xu K, Klymchenko A, Solvatochromic S, Danylchuk DI, Moon S, Xu K, Klymchenko S (2019) Switchable solvatochromic probes for live-cell super-resolution imaging of plasma membrane organization. *Angew Chemie - Int Ed* 58(42):14920-14924
33. Shao T, Liu T, Liu H, Zhang M, Shen Y, Gao A, Tian X, Zhang Q, Wu J, Tian Y (2019) Identification of fatty liver disease at diverse stages using two-photon absorption of triphenylamine-based BODIPY analogues. *J Mater Chem B* 7(23):3704-3709
34. Wang H, Dong M, Wang H, Huang F, Li P, Zhang W, Zhang W, Tang B (2021) Ultrasensitive and ratiometric two-photon fluorescence imaging of Golgi polarity during drug-induced acute kidney injury. *Chem Commun* 57(47):5838-5841
35. Danylchuk DI, Jouard PH, Klymchenko AS (2021) Targeted solvatochromic fluorescent probes for imaging lipid order in organelles under oxidative and mechanical stress. *J Am Chem Soc* 143(2):912-924
36. Wan W, Zeng L, Jin W, et al (2021) A solvatochromic fluorescent probe reveals polarity heterogeneity upon protein aggregation in cells. *Angew Chemie - Int Ed* 60(49):25865-25871
37. Biswas S, Baruah M, Shil A, Sarkar S, Ali M, Samanta A, Bhuniya S (2023) Polarity-driven two-photon fluorescent probe for monitoring the perturbation in lipid droplet levels during mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. *ACS Sensors* 8(10):3793-3803
38. Javorsky A, Humbert PO, Kvensakul M (2023) Viral manipulation of cell polarity signalling. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1870(7):119536
39. Wu T, Duan L, Yang J, Zhou Y (2023) A multidimensional quantitative fluorescent probe for high-fidelity monitoring of the polarity change in lysosomes during autophagy. *Sensors Actuators B Chem* 393(June):134142
40. Thomas D, Rubio V, Iragavarapu V, Guzman E, Pelletier OB, Alamgir S, Zhang Q, Stawikowski MJ (2021) Solvatochromic and pH-sensitive fluorescent membrane probes for imaging of live cells. *ACS Chem Neurosci* 12(4):719-734
41. Bai Q, Yang C, Yang M, et al (2022) pH-dominated selective imaging of lipid droplets and mitochondria via a polarity-reversible ratiometric fluorescent probe. *Anal Chem* 94(6):2901-2911
42. Li Mingrui, Wang Bowei, Liu Jiayi, Zhanga Zizhuo, Chen Ligong, Li Yang YX (2021) Lipid droplet-specific dual-response fluorescent probe for the detection of polarity and H₂O₂ and its application in living cells. *Anal Chem* 94(27):9732-9739
43. Zhang S, Zheng H, Yang L, Li Z, Yu M (2023) NIR mitochondrial fluorescent probe for visualizing SO₂/polarity in drug induced inflammatory mice. *Anal Chem* 95(12):5377-5383
44. Zan Q, Fan L, Ma L, Yang Q, Zhao K, Huang Y, Dong C, Shuang S (2023) Dual-channel fluorescent probe for simultaneously detecting H₂S and viscosity/polarity and its application in non-alcoholic fatty liver, tumor tissue, and food spoilage. *Sensors Actuators B Chem* 397(August):134596
45. Qi YL, Wang HR, Kang QJ, Chen LL, Qi PF, He ZX, Yang YS, Zhu HL (2022) A versatile fluorescent probe for simultaneously detecting viscosity, polarity and nitroreductases and its application in bioimaging. *Sensors Actuators B Chem* 352(P2):130989
46. Morris R, Black KA, Stollar EJ (2022) Uncovering protein function: From classification to complexes. *Essays Biochem* 66(2):255-285
47. Mazmanian K, Sargsyan K, Lim C (2020) How the local environment of functional sites regulates protein function. *J Am Chem Soc* 142(22):9861-9871
48. Prabhu GRD, Yang TH, Shiu RT, Witek HA, Urban PL (2022) Scanning pH-metry for observing reversibility in protein folding. *Biochemistry* 61(21):2377-2389
49. Speer SL, Zheng W, Jiang X, Chu I Te, Guseman AJ, Liu M, Pielak GJ, Li C (2021) The intracellular environment affects protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(11):1-7
50. Li C, Tebo AG, Gautier A (2017) Fluorogenic labeling strategies for biological imaging. *Int J Mol Sci* 18(7):1473
51. Thorn K (2017) Genetically encoded fluorescent tags. *Mol Biol Cell* 28(7):848-857
52. Erdmann RS, Baguley SW, Richens JH, et al (2019) Labeling strategies matter for super-resolution microscopy: a comparison between HaloTags and SNAP-tags. *Cell Chem Biol* 26(4):584-592
53. Kowada T, Watanabe T, Amagai Y, Liu R, Yamada M, Takahashi H, Matsui T, Inaba K, Mizukami S (2020) Quantitative imaging of labile Zn²⁺ in the Golgi apparatus using a localizable small-molecule fluorescent probe. *Cell Chem Biol* 27(12):1521-1531
54. Bachollet SPJT, Pietrancosta N, Mallet J, Dumat B, References S (2022) Fluorogenic and genetic targeting of a red-emitting molecular calcium indicator. *Chem Commun* 58:6594-6597
55. Wang C, Song X, Chen L, Xiao Y (2017) Specifically and wash-free labeling of SNAP-tag fused proteins with a hybrid sensor to monitor local micro-viscosity. *Biosens Bioelectron* 89(August 2016):757-764
56. Chambers JE, Kubánková M, Huber RG, López-Duarte I, Avezov E, Bond PJ, Marciniak SJ, Kuimova MK (2018) An optical technique for mapping microviscosity dynamics in cellular organelles. *ACS Nano* 12(5):4398-4407
57. Pandey NK, Varkey J, Ajayan A, George G, Chen J, Langen R (2024) Fluorescent protein tagging promotes phase separation and alters the aggregation pathway of huntingtin exon-1. *J Biol Chem* 300(1):105585
58. Amaike K, Tamura T, Hamachi I (2017) Recognition-driven chemical labeling of endogenous proteins in multi-molecular crowding in live cells. *Chem Commun* 53(88):11972-11983
59. Tamura T, Hamachi I (2019) Chemistry for Covalent Modification of Endogenous/Native Proteins: From Test Tubes to Complex Biological Systems. *J Am Chem Soc* 141(7):2782-2799
60. Peng T, Hang HC (2016) Site-specific bioorthogonal labeling for fluorescence imaging of intracellular proteins in living cells. *JACS* 138(43):14423-14433
61. Shu Y, Liu Y, Gao Y, Li J (2023) pH-Triggered mitochondria targeting fluorescent probe for detecting monoamine oxidases A in living cells. *Sensors Actuators B Chem* 390(May):133912
62. Jing C, Wang Y, Song X, Li X, Feng Y, Kou M, Zhang G, Dou W, Liu W (2022) A dual-fluorophore and dual-site multifunctional fluorescent sensor for real-time visualization of mitochondrial ONOO⁻/GSH cross-talk in living cells. *Sensors Actuators B Chem* 365(March):131847
63. Shi L, Yang S, Hong HJ, Li Y, Yu HJ, Shao G, Zhang K, Gong SZ (2020) A novel target and pH dual-activatable fluorescent probe for precisely detecting hypochlorite in lysosomes. *Anal Chim Acta* 1094:122-129
64. Xia Q, Feng S, Hong J, Feng G (2021) One probe for multiple targets: A NIR fluorescent rhodamine-based probe for ONOO⁻ and lysosomal pH detection in live cells. *Sensors Actuators, B Chem* 337(December 2020):129732
65. Liu H, Zeng X, Yin H, Chen J, Xie W, Zhou G, Mao G, Zhou Y, Yang S (2023) A pH-switchable azo-based fluorescence reporter for lysosome-confined visualization of hypoxia status. *Sensors Actuators B Chem* 381(November 2022):133431

66. Chen S, Ma X, Wang L, Wu Y, Wang Y, Fan W, Hou S (2023) Design and application of lysosomal targeting pH-sensitive β -galactosidase fluorescent probe. *Sensors Actuators B Chem* 379(December 2022):133272
67. Xu X, Xu H, Ji HF (2001) New fluorescent probes for the detection of mixed sodium and potassium metal ions. *Chem Commun* 1(20):2092–2093
68. Komatsu H, Miki T, Citterio D, Kubota T, Shindo Y, Kitamura Y, Oka K, Suzuki K (2005) Single molecular multianalyte (Ca^{2+} , Mg^{2+}) fluorescent probe and applications to bioimaging. *J Am Chem Soc* 127(31):10798–10799
69. Zhou X, Wu X, Yoon J (2015) A dual FRET based fluorescent probe as a multiple logic system. *Chem Commun* 51(1):111–113
70. Sakunkaewkasem S, Petdum A, Panchan W, Sirirak J, Charoenpanich A, Sooksimuang T, Wanichacheva N (2018) Dual-analyte fluorescent sensor based on [5]helicene derivative with super large Stokes shift for the selective determinations of Cu^{2+} or Zn^{2+} in buffer solutions and its application in a living cell. *ACS Sensors* 3(5):1016–1023
71. Aydin D (2020) A novel turn on fluorescent probe for the determination of Al^{3+} and Zn^{2+} ions and its cells applications. *Talanta* 210:120615
72. Velmurugan K, Vickram R, Karthick R, Jipsa C V., Suresh S, Prabhakaran G, Prabhu J, Velraj G, Nandhakumar R (2020) Binol diaryl dipyrrene fluorescent probe: Dual detection of silver and carbonate ions and its bioimaging applications. *J Photochem Photobiol A Chem* 401(July):112737
73. Ta S, Das S, Ghosh M, Banerjee M, Hira SK, Manna PP, Das D (2019) A unique benzimidazole-naphthalene hybrid molecule for independent detection of Zn^{2+} and N_3^- ions: Experimental and theoretical investigations. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* 209:170–185
74. Winterbourn CC (2018) Biological production, detection, and fate of hydrogen peroxide. *Antioxidants Redox Signal* 29(6):541–551
75. Wang Z, Yeo JH, New EJ (2021) Elucidating the roles of Fenton reactants in drug-treated cells by using a selective rhodamine-thiophenol fluorogenic sensor. *Anal Sens* 1(2):90–94
76. Chen J, Wang M, Yang X, Yuan M, Liu H, Cheng P, Xu K (2024) Specific and sequential detection of hydrogen sulfide and hypochlorous acid based on a ring-forming reaction and self-assembly. *Sensors Actuators B Chem* 405(January):135313
77. Fang Y, Shi W, Hu Y, Li X, Ma H (2018) A dual-function fluorescent probe for monitoring the degrees of hypoxia in living cells: Via the imaging of nitroreductase and adenosine triphosphate. *Chem Commun* 54(43):5454–5457
78. Wu L, Liu J, Tian X, et al (2022) Dual-channel fluorescent probe for the simultaneous monitoring of peroxynitrite and adenosine-5'-triphosphate in cellular applications. *J Am Chem Soc* 144(1):174–183
79. Tian DH, Liu JR, Wang SY, Yan S, Chai ZH, Dai F, Zhang S, Zhou B (2022) Selective imaging of hydrogen peroxide over peroxynitrite by a boronate-based fluorescent probe engineered via a doubly activated electrophilicity-increasing strategy. *Sensors Actuators B Chem* 368(March):132149
80. Xia HC, Li H, Zhang WL, Kong YY (2023) Synthesis and application of dual-channel fluorescent probes for selective recognition of $\text{SO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$. *Sensors Actuators B Chem* 378(December 2022):133146
81. Tian L, Sun X, Zhou L, Zhong K, Li S, Yan X, Tang L (2023) Reversible colorimetric and NIR fluorescent probe for sensing $\text{SO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ in living cells and food samples. *Food Chem* 407(November 2022):135031
82. Jing X, Peng H, Han S, Zhao Y, Lin W (2023) A multicolor reversible fluorescent probe for detecting SO_2 and H_2O_2 : Revealing redox imbalance in ischemia-reperfusion model. *Sensors Actuators B Chem* 396(July):134615
83. Han Y, Huang Y, Lin Q, Tang L, Yang G, Xin H, Zhao S, Guan R, Wang KN, Cao D (2023) Bifunctional fluorescent probe for the recognition of hydrazine and bisulfite in lipid droplets. *Sensors Actuators B Chem* 393(June):134181
84. Bhosle AA, Banerjee M, Saha S, Garg S, Ghosh S, Chatterjee A (2023) An NIR-emissive AIEgen with dual sensing ability: An azine-based chemodosimeter for discriminative ppb-level detection of hydrazine and bisulfite ions. *Sensors Actuators B Chem* 397(May):134661
85. Chen R, Hu T, Xing S, Wei T, Chen J, Li T, Niu Q, Zhang Z, Ren H, Qin X (2023) A dual-responsive fluorescent turn-on sensor for sensitively detecting and bioimaging of hydrazine and hypochlorite in biofluids, live-cells, and plants. *Anal Chim Acta* 1239(October 2022):340735
86. Zhang C, Liu C, Nie S, Zhang Y, Guo J, Li X, Liu C (2023) A dual functional fluorescent probe based on phenothiazine for detecting Hg^{2+} and ClO^- and its applications. *J. Fluoresc.*
87. Zhang C, Yuan M, Han G, Gao Y, Tang C, Li X, Du L, Li M (2018) Novel caged luciferin derivatives can prolong bioluminescence imaging: In vitro and in vivo. *RSC Adv* 8(35):19596–19599
88. Li S, Ruan Z, Zhang H, Xu H (2021) Recent achievements of bioluminescence imaging based on firefly luciferin-luciferase system. *Eur J Med Chem* 211:113111
89. Tung JK, Berglund K, Gutekunst C-A, Hochgeschwender U, Gross RE (2016) Bioluminescence imaging in live cells and animals. *Neurophotonics* 3(2):025001
90. Takakura H (2021) Molecular design of D-luciferin-based bioluminescence and 1,2-dioxetane-based chemiluminescence substrates for altered output wavelength and detecting various molecules. *Molecules* 26(6):1618
91. Su TA, Bruemmer KJ, Chang CJ (2019) Caged luciferins for bioluminescent activity-based sensing. *Curr Opin Biotechnol* 60:198–204
92. Yadav AK, Chan J (2023) Activity-based bioluminescence probes for in vivo sensing applications. *Curr Opin Chem Biol* 74:102310
93. Syed AJ, Anderson JC (2021) Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chem Soc Rev* 50(9):5668–5705
94. Mezzanotte L, van 't Root M, Karatas H, Goun EA, Löwik CWGM (2017) In vivo molecular bioluminescence imaging: New tools and applications. *Trends Biotechnol* 35(7):640–652
95. Wang C, Hong Y, Dong L, Cheng H, Jin D, Zhao R, Yu Z, Yuan Y (2023) An AND-gate bioluminescent probe for precise tumor imaging. *Chem Sci* 14(21):5768–5773
96. Van De Bittner GC, Bertozzi CR, Chang CJ (2013) Strategy for dual-analyte luciferin imaging: In vivo bioluminescence detection of hydrogen peroxide and caspase activity in a murine model of acute inflammation. *J Am Chem Soc* 135(5):1783–1795
97. Wang C, Du W, Zhang T, Liang G (2020) A bioluminescent probe for simultaneously imaging esterase and histone deacetylase activity in a tumor. *Anal Chem* 92(23):15275–15279
98. Grimm JB, Muthusamy AK, Liang Y, et al (2017) A general method to fine-tune fluorophores for live-cell and in vivo imaging. *Nat Methods* 14(10):987–994

Multi-analyte, small-molecule luminescent probes for simultaneous detection of several molecular targets in cellular models

Anna Wychowaniec¹, Francesca Canyelles i Font¹, Masroor A. Khan², Michał Gładysz³, Dorota Kwiatek^{1,3}, Jacek Ł. Kolanowski^{1,3}✉

¹Laboratory of Molecular Assays and Imaging, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

²Laboratory of Medicinal Chemistry, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

³Centre for Chemical Biology, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

✉corresponding author: jkolanowski@ibch.poznan.pl

Keywords: luminescent probes, multi-analyte probes, responsive probes, fluorescent probes, masked bioluminescent probes, fluorescent imaging

ABSTRACT

Luminescence has found wide application in biology, biotechnology and medicine. In particular, fluorescent and bioluminescent probes allow the visualization of molecular targets at the cellular level, and even macromolecules or single small-molecule analytes. The most reliable tools for visualizing molecular targets include the so-called responsive probes that change the intensity and color of the emitted signal after interaction with a given analyte (molecular target). The majority of responsive probes described so far in the literature allow for the reliable detection of a single analyte. Meanwhile, most of the processes occurring in the human body involve many elements at the same time. To better understand and study these mechanisms, it is possible to use several responsive probes at the same time, or the so-called multi-responsive and multi-analyte probes. The use of the latter increases the reliability of the obtained results and facilitates their interpretation. The article will discuss examples of multi-analyte probes divided according to their response mechanism and detected changes inside the cell.

