

Alkilni analozi ugljikohidrata za označavanje i vizualizaciju glikokonjugata u stanicama

Hukelj, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:404184>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Marina Hukelj

**Alkilni analozi ugljikohidrata za označavanje i vizualizaciju
glikokonjugata u stanicama**

Završni rad

Mentor: dr.sc. Valentina Pavić, docent

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Preddiplomski sveučilišni studij Biologija
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Završni rad

Alkilni analozi ugljikohidrata za označavanje i vizualizaciju glikokonjugata u stanicama

Marina Hukelj

Rad je izrađen na: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka

Mentor: dr.sc. Valentina Pavić, doc.

Kratak sažetak završnog rada:

Glikozilacija je evolucijski vrlo uspješan mehanizam jer je danas poznato kako su gotovo svi važni membranski i izvanstanični proteini glikozilirani. Uloga pojedinog glikana može se razlikovati ovisno o tkivu u kojem se nalazi, stupnju razvoja organizma, okolišnim čimbenicima i drugim faktorima. Struktura glikana posljedica je međuodnosa stotina gena te je kao takva i ona sama osjetljiva na svaku promjenu fiziologije stanice. Posljedično, mnoga su patološka stanja u organizmu povezana sa specifičnim promjenama u glikanskim strukturama i upravo te promjene predstavljaju temelje novim dijagnostičkim i prognostičkim postupcima. Međutim, stanični glikani proizlaze iz procesa kojim se ne može genetski manipulirati što čini izolaciju i identifikaciju strukturne analize glikana jedanim od najzahtjevnijih i najvažnijih zadataka u glikobiologiji. Ključ za označavanje glikana zahtjeva uključivanje kemijski modificiranih šećera u stanične glikane putem normalnih biosintetskih puteva. Razvoj alata za istraživanje stanične aktivnosti glikana pomoći će u određivanju molekularne osnove za aberantnu glikozilaciju u patološkim procesima kao što je rak.

Ključne riječi: glikokonjugati, glikozilacija, klik-kemija, azid-alkin cikloadicija

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu

BASIC DOCUMENTATION CARD
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Biology
Undergraduate university study programme in Biology
Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

Bachelor thesis

Alkynyl carbohydrate analogs for labeling and visualization of glycoconjugates in cells

Marina Hukelj

Thesis performed at: Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry

Supervisor: Valentina Pavić, PhD, *Assistant Professor*

Short abstract:

Glycosylation is an evolutionary highly successful mechanism because today it is known that almost all membrane and extracellular proteins are glycosylated. The same glycan can have different roles in different tissues, at different times in development, in different environmental contexts or for some other factor. Glycan structure is a result of an interplay between hundreds of genes and is therefore sensitive to all changes in the physiology of the cell. Consequently, many pathological conditions in the organism are associated with specific changes in glycan structures and these changes are the basis for new diagnostic and prognostic procedures. However, cellular glycans are resulting from a process that cannot be manipulated genetically which makes the isolation and identification of glycans for structural analysis one of the most challenging and defining tasks in glycobiology. The key to glycan tagging entails incorporating chemically modified-sugars into cellular glycans via normal biosynthetic pathways. Developing tools for investigating the cellular activity of glycans will help to delineate the molecular basis for aberrant glycosylation in pathological processes such as cancer.

Key words: glycoconjugates, glycosylation, click-chemistry, azide-alkyne cycloaddition

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. ALKILNI ANALOZI UGLJIKOHIDRATA ZA OZNAČAVANJE I VIZUALIZACIJU GLIKOKONJUGATA U STANICAMA	3
2.1. LEKTINI	3
2.2. PROTUTIJELA	4
2.3. SIJALINSKE KISELINE	5
2.4. KLIK-KEMIJA U GLIKOBIOLOGIJI BAZIRANA NA AZIDU	8
2.4.1. AZID-ALKIN CIKLOADICIJA	9
2.4.2. SOJ POSPJEŠENA ALKIN-AZID CIKLOADICIJA	12
2.4.3. AZID-STAUDINGEROVA LIGACIJA	13
2.5. RADIOIZOTOPI.....	14
3. ZAKLJUČAK	15
4. LITERATURA	16

POPIS KRATICA

6AzFuc – per-*O*-acetilirana 6-azidofukoza

Ac4ManNAz – per-*O*-acetilirani *N*-azidoacetilglukozamin

Asn-X-Ser – asparagin-*X*-serin

Asn-X-Thr – asparagin-*X*-treonin

BARAC – biarilazaciklooktinon (engl. *Biarylazacyclooktinone*)

CMAH – hidroksilaza citidin monofosfo-*N*-acetilneuraminske kiseline (engl. *Cytidine Monophospho-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase*)

CMP-Neu5Ac – citidin-5'-monofosfat *N*-acetilneuraminska kiselina

CMP-Neu5Gc – citidin-5'-monofosfat *N*-glikolilneuraminska kiselina

CRD – domene koja prepoznaje ugljikohidrate (engl. *carbohydrate recognition domain*)

CuAAC – bakarom katalizirana azid-alkin cikloadicija (engl. *Copper(I)-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition*)

DIFO – difluorirani ciklooktin

Fuc – fukoza

Gal – galaktoza

GalNAc – *N*-acetilgalaktozamin

Glu – glukoza

GNE – UDP-*N*-acetilglukozamin 2-epimeraza/*N*-acetilmanozamin kinaza

IgM – imunoglobulin M

Kdn – 2-keto-3-deoksi-nonulosonska kiselina (ili deaminoneuraminska kiselina)

Man – manoza

ManNAc – *N*-acetilmanozamin

Neu5Ac – *N*-acetilneuraminska kiselina

Neu5Gc – *N*-glikolilneuraminska kiselina

O-GlcNAc – *O*-vezani *N*-acetilglukozamin

Sia – sijalinska kiselina

SiaNAz – azido sijalinska kiselina

SPAAC – azid-alkin cikloadiciju potaknutu napetošću prstena

TBTA – C3-simetrični derivat (ENGL. *Translocation Breakpoint Type A*)

THPTA tris (3-hidroksipropil-triazolilmetil) amin

Tn – GalNAc α Ser/Thr

UDP GlcNAc – 5'-difosfat-*N*-acetilglukozaminom

X – bilo koja aminokiselina osim treonina (Thr)

Xyl – ksiloza

1. UVOD

Nakon što je svijet biokemije dugo bio usmjeren na proteine i nukleinske kiseline, 1980-ih se godina otvorila nova grana koja se bavi biološkom ulogom ugljikohidrata, nazvana glikobiologijom. U središtu glikobiologije nalaze se glikani koji se sastoje od monosaharida međusobno povezanih glikozidnom vezom. Građevni su im blokovi strukture poput manoze, glukoze, galaktoze, fukoze, sijalinske kiseline, *N*-acetilglukozamina i *N*-acetilgalaktozamina. Glikozidna veza unutar glikana nastaje između anomerske hidroksilne skupine jednog monosaharida i bilo koje hidroksilne skupine drugog monosaharida. Zbog velike varijabilnosti glikozidnih veza, velik je broj mogućih di- i oligosaharida – više od 10 milijuna tetrasaharida može se sastaviti iz samo devet monosaharidnih građevnih blokova (Zeng i sur., 2012).

Glikozilacija je složen i visoko reguliran enzimski posredovan proces dodavanja šećernih struktura (glikana) na sintetizirane proteine ili lipide pri čemu nastaju glikokonjugati. Jedna je od naznačajnijih i najvarijabilnijih posttranslacijskih modifikacija proteina za što su odgovorni membranski enzimi glikoziltransferaze (Varki i sur., 2009; Lee i sur., 2005). Glikokonjugat čini jedna ili više monosaharidnih ili oligosaharidnih jedinica (glikon) kovalentno vezanih na neugljikohidratnu molekulu (aglikon). U glikokonjugatima udio molekule koji zauzima glikan može varirati u velikoj mjeri, od vrlo malog do gotovo kompletnog udjela. Procjenjuje se da je oko 80% proteina stanične membrane glikozilirano na način da su stanice složenih organizama prekrivene gustim slojem glikokonjugata – glikokaliksom. Glikokaliks je ključan posrednik u bilo kakvoj interakciji stanice s okolinom i bez njega stanica ne može preživjeti (Gagneux i Varki, 1999). Složena građa, funkcionalnost i dinamičke osobitosti glikana omogućuju ovim molekulama da funkcioniraju u međumolekulskim interakcijama. Biološke uloge glikana čine širok raspon od onih jedva zamjetnih, do ključnih uloga u rastu, razvoju, funkcioniranju i preživljavanju organizama u kojima se sintetiziraju (Varki i sur., 2009).

Općenito, glikani mogu doprinijeti funkciji proteina na tri načina. prvi način je predstavljajući sastavni dio proteina i time postaju ključni za njegovu osnovnu strukturu i funkciju, u vidu pravilnog smatanja, topljivosti i stabilnosti. Drugi način je precizno modulirajući strukturu proteina pomoću varijacija u glikanima koji su vezani na polipeptidni lanac i na taj način prilagođavajući njegovu funkciju specifičnim fiziološkim

zahtjevima. Treći način je stvarajući nezavisna vezna mjesta za receptore specifično glikan vezujućih proteina (Lauc i sur., 2015). Glikan vezujući proteini mogu se podijeliti na intrinzične i ekstrinzične - one koji prepoznaju vlastite glikane, odnosno one koji prepoznaju glikane drugih organizama, bilo da se radi o patogenima ili simbiotima (Varki i sur., 2009).

Razlikujemo skupina glikokonjugata: glikoproteini, glikopeptidi, peptidoglikani, glikolipidi, i lipopolisaharidi. Najviše istraživani su glikoproteini i proteoglikani. Kod glikoproteina, proteinski dio na sebe ima vezan jedan ili više ugljikohidratni lanac *N*- ili *O*-vezom, koji su uglavnom kratki i razgranati. Ovisno o mjestu vezanja ugljikohidratnog bočnog lanca, razlikujemo *N*-vezane i *O*-vezane glikoproteine. Kod *N*-vezanih glikoproteina, glikan je vezan na dušikov atom bočnog ogranka asparagina (smještenog unutar slijeda Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr, gdje je X bilo koja aminokiselina osim treonina), dok je kod *O*-vezanih glikoproteina vezan na serin ili treonin. Šećeri koji se izravno vežu na te položaje su *N*-acetilglukozamin (*N*-vezani šećeri) i *N*-acetilgalaktozamin (*O*-vezani šećeri). Glikoproteini su univerzalni za sve poznate organizme u kojima ujedno igraju i ključnu ulogu uz nukleinske kiseline, proteine i lipide (Varki i sur., 2009). Proteoglikani imaju na središnji protein vezan jedan ili više dugih glikozaminoglikanskih lanaca i većinom imaju veći glikanski udio od glikoproteina (Varki i sur., 2009). Monosaharidne podjedinice koje se najčešće pojavljuju u glikanima su fukoza (Fuc), galaktoza (Gal), glukoza (Glu), manozna (Man), *N*-acetilgalaktozamin (GalNAc), *N*-acetilglukozamin (GlcNAc), sijalinska kiselina (Sia) i ksiloza (Xyl) (Lauc i sur., 2014).

Površine eukariotskih stanica prekrivene su složenim glikanima koji sudjeluju u različitim fiziološkim procesima, uključujući angiogenezu, gnojidbu, embriogenezu, staničnu adheziju i razvoj neurona (Murrey i Hsieh Wilkson, 2008., Varki i sur., 2008.; Gupta i sur., 2009; Ma i sur., 2006), a upravo je glikozilacija omogućila njihov razvoj. Najvažnija evolucijska prednost koju glikani nude višim eukariotima mogućnost je stvaranja novih struktura bez uvođenja većih promjena u genskom nasljedstvu (Lauc i sur., 2014; Lauc i Zoldoš, 2010). Imajući na umu rasprostranjenost glikana unutar organizma, odnosno njihove raznolike utjecaje, jasno je da su biološke posljedice bilo kakvih izmjena u glikozilaciji vrlo varijabilne i nepredvidive, što otvara mogućnost za razvoj različitih bolesti i patoloških stanja (Varki i sur., 2009). U ljudi, promjene u staničnim glikomima povezane su s razvojnim poremećajima i nedostatcima (Varki i sur., 2008) te mogu označiti početak raka i upale (Brooks i sur., 2008; Dube i Bertozzi, 2005). Mnogi bakterijski i

virusni patogeni isprva prijavljuju na tkiva domaćina specifično se vezujući na njegove ugljikohidratne površine stanica (Sharon, 2007). Tumorske stanice koriste šećerne skupine na membranama kako bi prevarile imunološki sustav, patogeni koriste glikoproteine i glikolipide na membranama za adheziju na stanice, mnoge upalne reakcije izazvane su ugljikohidratima, a mnoge bolesti su povezane s ugljikohidratima ili njihovim metabolizmom (Varki, 1993). Stoga mijenjanje glikanskih struktura predstavlja jedno od važnijih načina obrane viših organizama od brzo razvijajućih patogena.

Prepoznavanja ugljikohidrata sastavni su dio normalnog biološkog razvoja (Haltiwanger i Lowe, 2004) i imunološke obrane protiv patogena identifikacijom egzogenih ugljikohidrata (Marth i Grewal, 2008). Sposobnost vizualizacije i karakterizacije tih promjena u živim sustavima unaprijedit će naše razumijevanje detaljnih uloga glikana u tim procesima i osigurati nove kliničke alate za dijagnosticiranje bolesti. U analizi profila i strukture glikana, koriste se različite kemijske i enzimске reakcije te analitičke tehnike, a odabir metode najčešće ovisi o količini i čistoći materijala te njegovom izvoru. Metode za početnu detekciju glikana u glikokonjugatima direktne su kemijske reakcije s monosaharidima glikana, radioaktivno obilježavanje ili obilježavanje s kemijski reaktivnim monosaharidima. Konvencionalne metode za detekciju površinskih glikana oslanjaju se na lektine i antitijela (Pilobello i Mahal, 2007; Comer i sur., 2001; David i sur., 1992; Duijvestijn i sur., 1988).

2. ALKILNI ANALOZI UGLJIKOHIDRATA ZA OZNAČAVANJE I VIZUALIZACIJU GLIKOKONJUGATA U STANICAMA

2.1. LEKTINI

Na površini stanica imunskog sustava postoje različiti receptori koji vežu glikane, lektini. Lektini su prirodni proteini koji nisu imunološkog podrijetla, odnosno, omogućuju vezanje jedne molekule na drugu bez uključivanja imunološkog sustava. Nalazimo ih u mikroorganizmima, biljkama i životinjama. Prepoznaju specifične glikane na okosnicama proteina i lipida, visoko su selektivni te mogu poslužiti za proučavanje varijacija glikana. Interakcije glikana i lektina obično su manjeg afiniteta od protein-protein interakcija no postoji visoka specifičnost kojom lektini vežu više dijelova glikana. Glikani na području

glikokaliksa mogu dostići milimolarne koncentracije te je vrlo teško glikanskim mimeticima poremetiti njihove interakcije s lektinskim receptorima. Nedavna istraživanja pokazuju neočekivanu selektivnost prema istim glikanskim ligandima prezentiranim na različitim glikoproteinima što ukazuje na utjecaj konformacije i različite aminokiselinske sekvence na afinitet lektina prema glikanskom ligandu. Fiziološki su receptori glikana (Dabelić, 2004) te kao takvi imaju sposobnost njihovog vezanja (Sharon, 2007) te široku primjenu za detekciju (Pilobello, 2007) i obogaćivanje glikokonjugata (Hirabayashi, 2004). Prepoznavanje glikana lektinom temelji se na specifičnim interakcijama domene koja prepoznaje ugljikohidrate (engl. *carbohydrate recognition domain*, CRD) (Dabelić, 2004) i određenog strukturnog motiva glikana. Lektini su opsežno korišteni za otkrivanje monosaharida i oligosaharida (Hirabayashi, 2008) i kao takvi su u stanju prepoznati raznolike strukture poput monosaharida sijalinske kiseline (Lehmann i sur., 2006) i fukoze (Pereira i sur., 1978) te strukture višeg reda kao što su Tn, odnosno GalNAc α Ser/Thr, (Ishiyama i Uhlenbruck, 1971) i sijalil-Tn tumorski antigeni (Mrkoci i sur., 1996) te konzervirana jezgrena regija N-glikana (Fan i Lee, 1997). Međutim, oni pokazuju nedostatak specifičnosti jer imaju slab afinitet za glikanski epitop i zahtijevaju viševalentnost za vezivanje visokom avidnošću (Kiessling i Pohl, 1996). Lektini su općenito nepropusni za tkivo i često su toksični (Ohba i Bakalova, 2003; Schwarz i sur., 1999). Iz tih je razloga korisnost lektina za bilježenje u živim sustavima ograničena, iako su široko korišteni za vizualizaciju glikana *ex vivo*.

Poznata je upotreba lektina za određivanje specifičnih glikana na kultiviranim staničnim linijama (Carlsson i sur., 2007; Lizzi i sur., 2007). Lektini su omogućili vizualizaciju glikana na tkivnim sekcijama ili cjelovitim uzorcima u diskretnim vremenskim točkama u embriogenezi miša (Griffith i Wiley, 1989), pileta (Griffith i Sanders, 1991) i muhe (Tian i Hagen, 2007), kao i u zrelom timusu miša (Paessens i sur., 2007), endotelnoj vaskulaturi štakora (Thurston i sur., 1996) i ljudskom bubregu (Truong i sur., 1988). Nadalje, lektini su korišteni kako bi se olakšao probir mutanata *Caenorhabditis elegans* s glikozilacijskim greškama (Link i sur., 1998; Link i sur. 1992).

2.2. PROTUTIJEJA

Protutijela su u stanju prepoznati vrlo specifične strukture glikana. Štoviše, dobro su karakterizirana komercijalno dostupna monoklonska antitijela koja vezuju različite

epitope na heparan (David i sur., 1992) i kondroitin sulfat (Avnur i Geiger, 1984), kao i sijalil Lewis x (Duijvestijn i sur., 1988), sulfoadhezin (Streeter i sur., 1988) i *O*-vezani *N*-acetilglukozamin (*O*-GlcNAc) (Comer i sur., 2001). Teoretski, protutijelo se može proizvesti protiv bilo kojeg glikanskog epitopa. Međutim, sinteza čak i malih glikanskih struktura može biti teška (Hang i Bertozzi, 2001), komplicirajući stvaranje haptena za imunizaciju. Poput lektina, protutijela su također nepropusna za tkiva, a većina protutijela koja nastaju protiv epitopa za glikan niskog su afiniteta IgM podtipa. Ipak, široka je primjena imunofluorescentne mikroskopije kultiviranih stanica ili sekcija tkiva. Antitijela su korištena za vizualizaciju glikana na fiksnim stanicama (de Graffenried i sur., 2004), kao i sekcije pileće rožnice (Young i sur., 2007), goveđe mliječne žlijezde (Hodgkinson i sur., 2007), zečjeg slijepog crijeva (Sinha i sur., 2006) i ljudskog timusa (Reza i Ritter, 1994). Prema tome, antitijela stvorena protiv glikanskih struktura mogu se snažno vezati na antigenska mjesta vezanja supstrata što omogućuje vizualizaciju tih molekila izvan stanice. Međutim, njihova velika veličina ograničava njihovu upotrebu unutar stanica.

L-selektin inicira kontakt između limfocita i visokih endotelnih stanica vezanjem na određene glikoproteine koji predstavljaju ugljikohidrate. U potrazi za visokim endotelnim venama specifičnim antigenima koji bi podržali L-selektin posredovano vezanje limfocita visokim endotelnim venama i omogućili *in vivo* primjenu, otkriveno je monoklonalno antitijelo MECA-79 (Licha i sur., 2005). MECA-79 sulfatirani je glikan koji služi kao ligand za leukocitnu adhezijsku molekulu L-selektina. On blokira usmjeravanje limfocita u limfne čvorove vežući se isključivo na endotelne stanice visokih endotelnih vena, kao i na aktivirani endotel u kronično upaljenim mjestima (Michie i sur., 1993; Onrust i sur., 1996) te na odbačena ljudska transplantirana srca (Toppila, 1999). MECA-79 definira ugljikohidratni epitop (Yeh i sur., 2001; Bruehl i sur., 2001; Hemmerich i sur., 1994) koji se specifično nalazi na malom broju glikoproteina izraženih na površini endotelnih stanica u visokim endotelnim venama, a također je marker patološke upale koja se javlja tijekom dijabetesa, astme i artritisa (Hemmerich i Rosen, 2000).

2.3. SIJALINSKE KISELINE

Sijalinske su kiseline obitelj α -keto kiselina monosaharida s kosturom od 9 ugljikovih jezgara tipično pronađenih kao najudaljenije jedinice glikanskih lanaca glikoproteina (Angata i sur., 2002). Obično se nalaze kao terminalni monosaharidi glikana

u glikokonjugatima (glikoproteini i glikolipidi), na staničnim površinama kralježnjaka i višim beskralježnjacima (Varki i sur., 2011; Chen i Varki 2010). Također su komponente lipooligosaharida ili kapsularnih polisaharida nekih patogenih bakterija uključujući dobro proučavane patogene *Escherichia coli K1* i *Streptococcus agalactiae* (Severi i sur., 2007; Almagro-Moreno i Boyd, 2009; Vimr i sur., 2004) te druge.

Zbog svojih najudaljenijih lokacija na površini staničnih glikana i njihove široko rasprostranjene pojave kod stanica kralježnjaka, sijalinske kiseline igraju ključne uloge u mnogim fiziološkim i patološkim važnim procesima, uključujući embriogenezu živčanog sustava, imunološku regulaciju, bakterijsku i virusnu infekciju pa sve do metastaza raka (Chen i Varki, 2010; Angata i Varki, 2002; Varki, 1997). Aberantna sijalilzacija i promijenjena ekspresija sjialiltransferaza uključeni su u progresiju raka i metastaza (Schultz i sur., 2012). Abnormalni metabolizam sijalinske kiseline u ljudi povezan je s različitim patološkim stanjima (Schwarzkopf i sur., 2002). Na primjer, mutacija humanog bifunkcionalnog enzima GNE s hidrolizirajućim uridinskim 5'-difosfat-N-acetilglukozaminom (UDP-GlcNAc) 2-epimerazom i N-acetilmanozamin (ManNAc) kinaznim aktivnostima povezana je s dva ljudska poremećaja uključujući žuticu i nasljednu miopatiju s mikroskopski vidljivog inkluzijskog tijela (Yardeni i sur., 2011).

Iako se putevi metabolizma sijalinske kiseline razlikuju u eukariotima i bakterijama, oboje uključuju koordinirano djelovanje nekoliko enzima koji kataliziraju biosintezu, aktivaciju i prijenos sijalinskih kiselina za stvaranje sijalilnih glikokonjugata, kao i modifikacije i degradacije sijalilnih glikokonjugata i sijalinskih kiselina. Sijalinske kiseline se također koriste kao izvor energije u bakterijama (Almagro-Moreno i Boyd, 2009), a postoje i izvještaji da prehrambene sijalinske kiseline igraju hranjive uloge kod sisavaca (Wang i Brand-Miller, 2003).

Glikani koji sadrže sijalinsku kiselinu mogu se vizualizirati metaboličkim obilježavanjem pomoću analoga svojih biosintetskih prekursora N-acetilmanozamina (ManNAc) ili derivatima sijalinske kiseline. Biosintetički će strojevi tolerirati dodavanje kemijskih repotertera na N-acilnu skupinu ili klase supstrata, npr. Ac4ManNAz (Saxon i Bertozzi, 2000), alkinil ManNAc (Hsu i sur., 2007) i SiaNAz (Luchansky i sur., 2004), ili na C-9 sijalinske kiseline, npr. 9-azido Neu5Ac (Kosa i sur., 1993). Doista, kada se stanične linije sisavaca inkubiraju s Ac4ManNAz, SiaNAz zamjenjuje 4-41% prirodnih sijalnih kiselina (Luchansky i sur., 2004). Ac4ManNAz korišten je za vizualizaciju sijalinskih

kiselina u raznolikom rasponu tipova stanica (Luchansky i sur., 2004), kao i živih miševa (Prescher i sur., 2004) i zebrica (Laughlin i sur., 2008). Alkinil ManNAc korišten je za vizualizaciju sijalinskih kiselina na staničnim linijama ljudskih karcinoma i za glikoproteomsku analizu obilježenih glikoproteina (Hsu i sur., 2007; Hanson i sur., 2007). Fukozilirani glikani, poput onih koji imaju sijalinsku kiselinu, uključeni su u bezbroj normalnih i patoloških procesa (Becker i Lowe, 2003). Metabolički su označeni primjenom per-O-acetilirane 6-azidofukoze (6AzFuc) ili per-O-acetilirane 6-alkinilukoze (alkinil fukoza). Dosad su ovi reporteri fukoze ograničeni na upotrebu u kultiviranim stanicama zbog niskih razina metabolizma i citotoksičnosti.

U prirodi je pronađeno više od 50 oblika sijalinske kiseline. Prvi od njih su bili glikokonjugati koji nose terminalnu monosaharidnu *N*-acetilneuraminsku kiselinu (Neu5Ac). Ovaj je šećer u području glikobiologije identificiran kao determinanta virusne infekcije, leukocitne endotelijske stanične adhezije, razvoja neurona, aktivacije imunološkog stanja, metastaza raka te je uključen u mnoge druge normalne i patološke procese (Varki NM i Varki A, 2007; Schauer, 2000).

O-GlcNAc-modificirani proteini (Hart i sur., 2007), koji se javljaju u citosolu i jezgri, obilježeni su bioortogonalnim kemijskim izvjestiteljima upotrebom bilo *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) ili GalNAc analoga. Per-*O*-acetilirani *N*-azidoacetilglukozamin (Ac4GlcNAz) (Vocadlo i sur., 2003) modificiran je pomoću enzima heksozaminskog metaboličkog puta GlcNAc da bi se formirao UDP-GlcNAz koji se koristi kao supstrat citosolnom *O*-GlcNAc transferazom. Alternativno, Ac4GalNAz se metabolizira tako da tvori UDP-GalNAz koji se *in situ* može pretvoriti u UDP-GlcNAz epimerazom (Laughlin i Bertozzi, 2007). Ac4GlcNAz je korišten za identifikaciju *O*-GlcNAc-modificirajućih proteina u staničnim lizatima (Vocadlo i sur.; 2003), a Ac4GalNAz je korišten za slike nuklearnih proteina modificiranih s *O*-GlcNAc u kultiviranim stanicama.

Obitelj sijalinskih kiselina uključuje i *N*-acetilneuraminsku kiselinu (Neu5Ac), ne-humanu *N*-glikolilneuraminsku kiselinu (Neu5Gc), 2-keto-3-deoksi-nonulosonsku kiselinu (ili deaminoneuraminsku kiselinu) (Kdn) te njihove O-metil, O-laktil, O-sulfo, O-fosfo-, pojedinačne ili višestruke O-acetilne derivate (Angata i Varki, 2002; Schauer, 2000; Chen i Varki 2010). Ljudi međutim ne mogu sintetizirati Neu5Gc zbog mutacije u CMAH genu koji kodira enzim koji CMP-Neu5Ac pretvara u CMP-Neu5Gc (Irie i sur., 1998).

2.4. KLIK-KEMIJA U GLIKOBIOLOGIJI BAZIRANA NA AZIDU

Tijekom razvoja glikobiologije, najutjecajni i najčešće korišten bioortogonalni reagens za obilježavanje glikana postao je azid – molekula male veličine i inertnosti na većinu sastojaka u biološkom okruženju koja ima sposobnost reakcija s drugim bioortogonalnim funkcionalnim skupinama pri fiziološkom pH (Sletten i Bertozzi, 2009). Azid može modificirati ne samo proteine, već i sve klase biomolekula, uključujući nukleotide, lipide i glikane, kao i druge metabolite.

Klik-kemija pojam je kojeg su 2001. godine definirali H. C. Kolb, M. G. Finn i K. Barry Sharpless, a odnosi se na modularne reakcije koje su stereospecifične, visokih iskorištenja, odvijaju se u jednostavnim uvjetima, široke su primjenjivosti i daju samo neškodljive nusprodukte. Polazni materijali moraju biti lako dostupni, a otapala, ako su potrebna, moraju biti ili neškodljiva ili lako uklonjiva. Produkti moraju biti stabilni u fiziološkim uvjetima te se moraju moći lako izolirati i pročistiti nekromatografskim metodama. Budući da su klik-reakcije modularne, stereospecifične i visokih prinosa, odgovaraju zahtjevima sinteza kompleksnih spojeva, pogotovo onih koji imaju farmakološku i biološku primjenu. Za biološke sustave najpogodnije klik-reakcije su bakrom(I) katalizirana azid-alkin cikloadicija, Staudingerova ligacija, Diels-Alderova reakcija s inverznim elektronskim zahtjevom te, rjeđe, adicija hidrazida na karbonilne skupine, Michaelova adicija tiola, tiol-en i tiol-in reakcije (Kolb i sur., 2001).

Postoje dva načina reaktivnosti bioortogonalne klik-kemije bazirane na azidima koji su bili razvijeni u glikobiološkim istraživanjima (Zeng i sur., 2013; Rouhanifard i sur., 2013; Baskin i sur., 2007). Jednom ugrađen u ciljni supstrat, azidi se mogu kovalentno kombinirati s njegovim komplementarnim partnerom. Prvi je način 1,3-dipol [3 + 2] cikloaddicija s alkinima, koja se dalje može podijeliti na bakarom kataliziranu azid-alkin cikloaddiciju (CuAAC), detektiranu linearnim alkinima (Rostovtsev i sur., 2002; Tornøe i sur., 2002), te na azid-alkin cikloaddiciju potaknutu napetošću prstena (SPAAC), detektiranu različitim ciklotinima (Baskin i sur., 2007; Agard i sur., 2006; Agard i sur., 2004). Drugi je način azid-Staudinger ligacija, u kojoj se azid detektira reakcijom s fosfinima (Saxon i Bertozzi, 2000).

Posebno u glikobiološkim istraživanjima azid i alkinski par bili su naširoko korišteni u metaboličkom inženjerstvu i označavanju monosaharida. Glikom u živim stanicama ili u živim organizmima istraživani korištenjem novih alata iz novog polja bioortogonalne klik-kemije (Baskin i Bertozzi, 2007; Laughlin i Bertozzi, 2009). Okupiranjem biosintetskih pogona glikana, monosaharidni blok koji je funkcionaliziran s bioortogonalnom kemijskom oznakom ugrađen je u ciljne glikokonjugate. Nakon toga se koristi konstruirana klik reakcija za konjugaciju komplementarne biofizičke sonde, koja omogućuje vizualizaciju (Laughlin i Bertozzi, 2009), ili obogaćivanje ciljnih glikoproteina za molekularnu identifikaciju (Hanson i sur., 2007. Wang i sur., 2010).

2.4.1. AZID-ALKIN CIKLOADICIJA

Pojam cikloadicije azid-alkina katalizirane bakrom (engl. *Copper(I)-Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition*, CuAAC), široko poznatim primjerom „klik“ kemije, osmislio je Sharpless 2002. (Demko i Sharpless, 2002). Cikloadicija azid-alkina opisana je kao bolja verzija Huisgenove cikloaddicije [2 + 3] s malom ovisnošću o otapalu i boljem pristupu načela klik-kemije (Kolb i sur., 2001). Prisutnost bakra uvelike je promijenila reakcijski mehanizam i poboljšala prinose, dramatično ubrzala cikloadicijsku reakciju, a najznačajnije, može se provesti ispod sobne temperature.

Otkriće reakcije cikloadicije azid-alkina katalizirane bakrom(I) (CuAAC) s Fokin/Sharpless (Rostovtsev i sur., 2002) i Meldal (Tornøe i sur., 2002) funkcionalnim skupinama potaknulo je napredovanje u mnogim znanstvenim disciplinama (Finn i Fokin, 2010; Meldal i Tornøe, 2008; Wu i Fokin, 2007; Moses i Moorhouse, 2007). Sposobnost pouzdanog formiranja stabilnih veza između ove dvije funkcionalne skupine u mnoštvu postavki, cijenjena je kao moćan alat koji stavlja CuAAC u središte klik-kemije (Kolb i sur., 2001). CuAAC je eksponencijalno istražena u organskoj sintezi, anorganskoj kemiji, kemiji polimera i biokemiji te se tako primjenjuje u biokonjugaciji (Kolb i Sharpless, 2003), površinskoj modifikaciji (Decréau i sur., 2010) i sintezi novih polimernih materijala (Lutz, 2007). Također, azid-alkin cikloadicija široko se koristi za obilježavanje glikana (Laughlin i Bertozzi, 2009) i otkrivanje glikoproteina u staničnim lizatima (Chang i sur., 2009; Hsu i sur., 2007) te za izradu kovalentnih veza između supstrata označenih s funkcionalnim skupinama, kao što su azidi ili alkinski koji su rijetki u prirodi. Takvo brzo

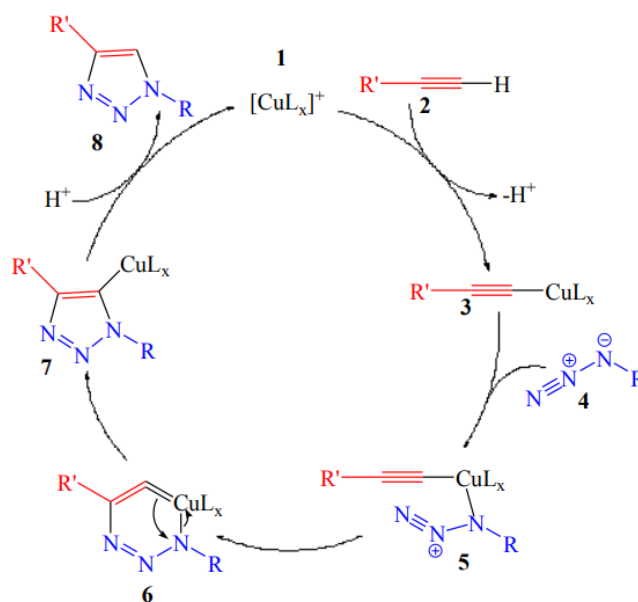
usvajanje CuAAC u gotovo svim područjima kemije i biokemije prilično je jedinstven slučaj koji pokazuje svestranost ove klik-reakcije.

Među nekoliko prednosti CuAAC, dvije važne značajke čine ovu reakciju posebno pogodnom za primjenu u bioznanosti. Prvo, CuAAC odvija se u vodenoj sredini i stoga se reakcije mogu učinkovito provesti u fiziološkim uvjetima. Drugo, a možda još i važnije, je da je CuAAC vrlo kemoselektivna reakcija i stoga se može koristiti za modificiranje vrlo kompliciranih biomolekula kao što su polipeptidi, nukleinske kiseline ili polisaharidi (Lutz i Zarafshani, 2008.) Također, jedna od najvažnijih činjenica reakcije CuAAC je da nastaje pod velikim brojem razvijenih uvjeta, ne nužno da samu reakciju učini bržom, već da bi se prilagodila različitim zahtjevima koji s kojima se rijetko susreću u laboratoriju tradicionalne sintetske organske kemije (Hong i sur., 2009; van Kasteren i sur., 2007). Sposobnost CuAAC reakcije da nastavi u širokom rasponu različitih uvjeta ukazuje na postojanje visokog stupnja mehaničke redundancije, kojom se azidni i alkinski supstrati mogu kanalizirati različitim putovima prema 1,4-supstituiranim 1,2,3-triazolima iznad potencijalne površine energije unatoč strašnim varijacijama u supstratnim strukturama i reakcijskim uvjetima. Takva situacija čini mehanističkim istraživanjima izazovna jer slijed događaja na reakcijskom koordinatumu i struktura intermedijera i katalitičkih vrsta varira kada se parametri reakcije mijenjaju po potrebi u kinetičkim istraživanjima.

Trenutna formulacija Cu(I) katalizatora ima dva glavna problema. Prvi problem su slobodni Cu(I) ioni koji su toksični za organizme čime se ograničava ova reakcija na uporabu s fiksnim stanicama ili tkivima (Sletten i Bertozzi, 2009; Prescher i Bertozzi, 2005.). Natrijev askorbat često se koristi za smanjenje Cu(I) oksidacijskog stanja, ali je potreban još jedan reagens jer Cu/askorbatni sustav generira količine reaktivnih vrsta, uključujući reaktivne kisikove vrste. Drugi je problem spora kinetika u vodenim otopinama pri mikromolarnim koncentracijama supstrata (Soriano del Amo i sur., 2010) što rezultira nepotpunom reakcijom cikloadicije (Kaltgrad i sur., 2007). Time se sprječava njegova upotreba u modifikaciji biomolekula ograničenih količina.

Svestranost CuAAC, koja se glatko odvija u vodenim i organskih otapalima, unutar širokog pH (4-12) i temperaturnom rasponu od 0 do 160 °C izazvala je veliki interes za objasnjenjem mehanizma. Mehanizam azid-alkin cikloadicije započinje koordinacijom alkina na Cu(I) uz izdvajanje jednog liganda čime nastaje bakrov acetilid. U sljedećem stupnju, jedan od liganda zamijenjen je azidom te bakrov kompleks veže dušik koji se

nalazi uz supstituent R formirajući intermedijer 5. Napadom terminalnog dušika azida u intermedijeru 5 na C-2 atom alkina nastaje šesteročlani Cu(III) kompleks čijom reorganizacijom nastaje peteročlana specija 7 koja proteolizom daje konačni produkt 8 (Dog i sur., 2010).



Slika 1. Mehanizam azid-alkin cikloadicije katalizirane Cu(I)

(Izvor: Glavač D., 2015)

Razvijeni su neki ligandi za stabilizaciju Cu(I) kako bi se dodatno ubrzala reakcija, kao što su C3-simetrični derivat (TBTA) (Chan i sur., 2004) i tris (3-hidroksipropil-triazolilmetil) amin (THPTA) (Hong i sur., 2010). Finn i suradnici (2010) primijenili su THPTA u kombinaciji s askorbatom u CuAAC što je dovelo do robusnog azid modificiranog *N*-acetilmanozamina (Ac4ManNaz), označivača za konfokalnu mikroskopiju (Hong i sur., 2010). Cikloadicija azid-alkina CuA (Cu) CuAAC (Rostovtsev i sur., 2002; Tornøe i sur., 2002) promovira Cu(I)-stabilizirajući ligand TBTA (Chan i sur., 2004), posjeduje lako dostupne reagense za spajanje i poboljšanu kinetiku (Hein i Fokin, 2010; Wu i Fokin, 2007).

Prednost ove metode je u tome što je vrlo lako ukloniti (Johns i sur., 2009) bakar iz reakcijske smjese, dok je njezin nedostatak u tome što je potrebno više bakra kako bi se katalizirala reakcija. Neka izvješća su pokazala da korištenje nano bakra(0) ili nano bakrenog praška može poboljšati učinkovitost. Međutim, nedostatak komercijalne

dostupnosti i visoka cijena rezultiraju time da će se čvrsti bakar i dalje koristiti kad se ukaže potreba (Appukkuttan i sur., 2004).

2.4.2. AZID-ALKIN CIKLOADICIJA POTAKNUTA NAPETOŠĆU PRSTENA

Azid-alkin cikloadicija potaknuta napetošću prstena (SPAAC) produžetak je CuAAC razvoja. Zbog toksičnih svojstava bakra koji mogu katalizirati reakcije atmosferskih kisika u obliku reaktivnih kisikovih vrsta, trebalo je optimizirati označavanje živih stanica bakrom kataliziranim azid-alkinskim kemijskim klikovima (Laughlin i sur., 2008; Agard i sur., 2004). Kako bi se izbjegla štetnost prijelaznih metala u biološkim sustavima, razvijene su klik-reakcije kod kojih se oslobađa znatna energija napetosti prstena i omogućuje odvijanje reakcije bez katalizatora. Osnova tih reakcija je brza cikloadicija između ciklooktina i azida. Istraživači su upotrijebili [3 + 2] cikloadiciju azida i ciklooktina kao promotora za aktivaciju azid-alkina (Jewett i sur., 2010; Agard i sur., 2006). Cikloadicija azida i ciklooktina nasljeđuje bio-benigne osobine Staudingerove ligacije, ali nadalje ima poboljšanu kinetiku (Jewett i Bertozzi, 2010; Ning i sur., 2008; Baskin i sur., 2007). Premda je SPAAC atraktivan i netoksičan pristup provođenju reakcija *in vitro* i *in vivo*, rijetko se koristi zbog manje brzine reakcije i iskorištenja u odnosu na CuAAC. Ipak, Bertozzi i suradnici proveli su ovu reakciju u svrhu obilježavanja glikana na površini stanice i praćenja njihove dinamike. Nakon njih, pokazalo se da uvođenje aromatskih supstituenata na ciklooktinski prsten dodatno ubrzava reakciju. Bertozzi i Boons grupe sintetizirale su poboljšane biotinizirane cikloktine koji mogu izravno reagirati sa stanicama označenim azidom, bez negativnih učinaka na vitalnost stanica (Agard i sur., 2004). Difluorirani ciklooktin (DIFO) (Baskin i sur., 2007) i biarilazaciklooktinon (BARAC) (Jewett i sur., 2010) pokazali su brzu kinetiku u biomolekularnim obilježavanjima.

Ipak, u usporedbi s CuAAC, klik kemija bez bakra i dalje je ograničena niskom učestalosti. Na temelju prethodnih studija, istraživači istražuju nove načine za povećanje učestalosti soj pospješene cikloadicije (Agard i sur., 2006). Različite vrste ciklooktinskih sonde, kao što su DIFO-FLAG, DIMAC-FLAG, ALO-FLAG mogu se izravno upotrijebiti za označavanje azidnih šećera u živim organizmima (Chang i sur., 2010), dok se za neke *in vitro* studije, osobito neke proteomske primjene, CuAAC čini najučinkovitija i

najprikladnija strategija. Trenutno, DIFO-fluoroforski konjugati prvi su izbor za određivanje glikana obilježenih azidima u živim sustavima (tj. embriju zebrice i *Caenorhabditis elegans*) (Laughlin i Bertozzi, 2009; Laughlin i sur., 2008). Štoviše, *in vivo* studije pokazale su da se sonde na bazi ciklooktina temelje nespecifično na mišjem serumskom albuminu, vjerojatno putem kovalentnih reakcija s cisteinskim ostacima (Chang i sur., 2010). Osim toga, konstrukcija tih ciklooktina uključuje višeslojnu linearnu sintezu koja može biti tehnički izazovna (Baskin i sur., 2007; Poloukhine i sur., 2009).

2.4.3. AZID-STAUDINGEROVA LIGACIJA

U Staudingerovoj ligaciji (Staudinger, 1919) između fosfina i azida nastaju aza-ilidi koji spontano hidroliziraju dajući primarni amin i odgovarajući fosfin-oksidi u visokom iskorištenju. Reakcija se odvija u vodi i pri sobnoj temperaturi. Budući da aza-ilid nije stabilan u vodi, reakcija se ne može primijeniti u biološkim sustavima stoga su je 2000. godine E. Saxon i C. R. Bertozzi izmijenili tako da nastaje adukt s amidnom vezom stabilan u vodi kao jedini produkt. Azid-Staudingerova ligacija također je poznata i kao azid-fosfinska ligacija bez traga (Saxon i Bertozzi, 2000). Ligacijom se formira kovalentna amidna veza između jednog dušikovog atoma azida i ester-funkcionaliziranog trifenilfosfina koji je također bioortogonalan što omogućuje *in vivo* primjenu (Saxon i Bertozzi, 2000). Ova se reakcija lako odvija pri pH 7 i ne zahtjeva katalizator te postiže visoko iskorištenje u vodi. Ono što je najvažnije, Staudingerovo legiranje zadovoljava većinu kriterija koji su potrebni u biološki kompatibilnom okruženju: brze reakcije unutar stanice, nusprodukti bez otrova te visoko iskorištenje i stabilnost u vodi.

Biotin-fosfini, FLAG-fosfini i druge tvari za obilježavanje dizajnirane su za određivanje glikana pomoću fluorescentnih sekundarnih reagensa (FITC-avidin i FITC-anti-FLAG antitijela) (Kiick i sur., 2002). Lemieux i suradnici izložili su fluorogenu kumarin-fosfinsku boju koja se može aktivirati azid-Staudinger ligacijom (Lemieux i sur., 2003). To je značajan alat za detekciju i kvantitativno određivanje modifikacija azidom, međutim, fosfini su redukcijska sredstva koja se lako oksidiraju zrakom ili metaboličkim enzimima kako bi se generirali nusproizvodi fosfinoksida. Iako je vrlo specifična, ligacija Staudinger pati od polagane reakcijske kinetike i konkurentske oksidacije fosfenskog reagensa (Baskin i sur., 2007).

Azid-Staudingerova ligacija je reakcija uspješno primijenjena za vizualizaciju sijaliliranih tumorskih stanica *in vivo* (Neves i sur., 2011). Peracetilirani azidoacetil manozamin injektiran je intraperitonealno kako bi se označile sijalinske kiseline s azidnom oznakom u golemim miševima s ugrađenim u tumor. Azidi povezani sijalinskom kiselinom zatim su reagirali Staudingerovom ligacijom s biotiniliranom fosfinskom sondom, a biotin je kasnije detektiran intravenskom injekcijom dalekocrvenog fluorofora, DOTA-111 In-konjugiranog neutravidina. Dvadeset i četiri sata nakon primjene derivata neutravidina, miševi su snimljeni pomoću optičkog snimanja ili kompjutorske tomografije s jednom fotonskom emisijom. Pozitivni signal, koji je rezultat azidom ovisnog obilježavanja, prvenstveno je otkriven u tumorima. Budući da je povećana sijalizacija snažno korelirana s transformiranim fenotipom mnogih karcinoma, ova tehnika može biti prevedena u kliničko okruženje za praćenje progresije raka (Boyangzi i sur., 2016.).

2.5. RADIOIZOTOPI

Glikani također mogu biti metabolički obilježeni monosaharidima koji sadrže radioizotop (Becker i Lowe, 2003; Jork i sur., 1984). Međutim, naknadna vizualizacija radioizotopno obilježenih glikana u netaknutim stanicama nije dobro riješena te nije prikladna za sadašnje tehnike fluorescencijske mikroskopije.

4. ZAKLJUČAK

Otkriće glikozilacije označilo je otkriće značajnog evolucijskog pomaka jer se promjenom ugljikohidratnog izražaja stanica mogu stvoriti nove strukture mijenjanjem ekspresije gena, unutarstaničnog smještaja i aktivnosti putova sinteze enzima odgovornih za glikozilaciju. Proučavanje glikozilacije proteina u biološkim tekućinama i tkivima ima značajnu medicinsku važnost jer su promjene u strukturama glikana sada povezane s nizom bolesti. Vizualizacija temeljena na lektinima i protutijelima daje samo snimku označenih glikokonjugata u određenoj vremenskoj točki zbog čega ih je teško primijeniti za dinamične studije u staničnom okruženju. Nadalje, s ograničenom primjenom *in vivo*, ti reagensi zahtijevaju odstranjivanje istraživanih stanica ili tkiva iz njihovog prirodnog okoliša prije analize. Za razliku od lektina i protutijela, kemoselektivna ligacija *in vivo* više djeluje kao most između stanica i umjetnih sintetičkih supstanci konstruiranih za manipulaciju biološkim procesima. Razvoj komplementarnih metoda za takvu vizualizaciju glikokonjugata omogućio je neinvazivno određivanje glikana te je uvelo alat glikomske analize. Azidne i alkinske reakcije nisu podjednako kompatibilne sa živim sustavima. Budući da je Cu katalizator potreban u CuAAC reakciji citotoksičan, ova se reakcija ograničava na uporabu s fiksnim stanicama ili tkivima. Prema tome, za studije koje uključuju žive organizme, čini se da su Staudingerova ligacija i azid-alkin cikloadicija potaknuta napetošću prstena bolji izbor.

5. LITERATURA

Agard, N.J., Baskin, J.M., Prescher, J.A., Lo, A., Bertozzi, C.R. (2006) A comparative study of bioorthogonal reactions with azides. *ACS Chemical Biology* 1, 644–648.

Agard, N.J., Prescher, J.A., Bertozzi, C.R. (2004) A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *Journal of the American Chemical Society* 126:15046–15047.

Almagro-Moreno, S., Boyd, E.F. (2009) Insights into the evolution of sialic acid catabolism among bacteria. *BMC Evolutionary Biology*. 9:118.

Almagro-Moreno, S., Boyd, E.F. (2009) Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic *Vibrio cholerae* in the mouse intestine. *Infection and Immunity* 77(9):3807–3816.

Angata, T., Varki, A. (2002) Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical Reviews* 102(2):439–469.

Appukkuttan, P., Dehaen, W., Fokin, V. V., van der Eycken, E. (2004) A Microwave-Assisted Click Chemistry Synthesis of 1,4-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via a Copper(I)-Catalyzed Three-Component Reaction. *Organic Letters* 6, 4223-4225.

Avnur, Z., Geiger, B. (1984) Immunocytochemical localization of native chondroitin-sulfate in tissues and cultured cells using specific monoclonal antibody. *Cell* 38:811–822.

Baskin, J.M., Bertozzi, C.R. (2007) Bioorthogonal click chemistry: Covalent labeling in living systems. *QSAR & Combinatorial Science* 26:1211–1219.

Baskin, J.M., Prescher, J.A., Laughlin, S.T., Agard, N.J., Chang, P.V., Miller, I.A., Lo, A., Codelli, J.A., Bertozzi, C.R. (2007) Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 104:16793–16797.

Becker, D.J., Lowe, J.B. (2003) Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13:41R–53R.

Boyangzi, L., Mock, F., Wu, P., (2016) Imaging the Glycome in living system. *Methods in Enzymology* 505; 401-419.

- Brooks, S.A., Carter, T.M., Royle, L., Harvey, D.J., Fry, S.A., Kinch, C., Dwek, R.A., Rudd, P.M. (2008) Altered glycosylation of proteins in cancer: What is the potential for new anti-tumour strategies. *Anticancer Agents Medicinal Chemistry* 8:2–21.
- Bruehl, R.E., Bertozzi, C.R., Rosen, S.D. (2001) Minimal sulfated carbohydrates for recognition by L-selectin and the MECA-79 antibody. *The Journal of Biological Chemistry* 275:32642–32648.
- Carlsson, S., Carlsson, M.C., Leffler, H. (2007) Intracellular sorting of galectin-8 based on carbohydrate fine specificity. *Glycobiology* 17:906–912.
- Chan, T.R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V. (2004) Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Organic Letters* 6, 2853–2855.
- Chang, P.V., Chen, X., Smyrniotis, C., Xenakis, A., Hu, T., Bertozzi, C.R., Wu, P. (2009) Metabolic labeling of sialic acids in living animals with alkynyl sugars. *Angewandte Chemie International Edition* 48:4030–4043.
- Chang, P.V.; Prescher, J.A.; Sletten, E.M.; Baskin, J.M.; Miller, I.A.; Agard, N.J.; Lo, A.; Bertozzi, C.R. (2010) Copper-free click chemistry in living animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 107, 1821–1826.
- Chen, X., Varki, A. (2010) Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chemical Biology* 5:163–176.
- Comer, F.I., Vosseller, K., Wells, L., Accavitti, M.A., Hart, G.W. (2001) Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for O-linked N-acetylglucosamine. *Analytical Biochemistry* 293:169–177.
- Dabelić, S. (2004) Utjecaj tvari s imunomodulatornim djelovanjem na galektin-3 / Doktorska disertacija. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- David, G., Bai, X.M., Van der Schueren, B., Cassiman, J.J., Van den Berghe, H. (1992) Developmental changes in heparan sulfate expression: In situ detection with mAbs. *The Journal of Cell Biology* 119:961–975.
- de Graffenried, C.L., Laughlin, S.T., Kohler, J.J., Bertozzi, C.R. (2004) A small-molecule switch for Golgi sulfotransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 101:16715–16720.

Decréau, R.A., Collman, J.P., Hosseini, A. (2010) Electrochemical applications. How click chemistry brought biomimetic models to the next level: electrocatalysis under controlled rate of electron transfer. *Chemical Society Reviews* 39:1291–1301.

Demko, Z.P., Sharpless, K.B. (2002) A click chemistry approach to tetrazoles by Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition: synthesis of 5-acyltetrazoles from azides and acyl cyanides. *Angewandte Chemie International Edition* 41, 2113–2116.

Dog, A., Durman, H., Kirmizi, V., Hizal, G., Tunca, V. (2010) *Polymer Chemistry* 1, 621-623.

Dube, D.H., Bertozzi, C.R. (2005) Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutics and diagnostics. *Nature Reviews Drug Discovery* 4:477–488.

Duijvestijn, A.M., Horst, E., Pals, S.T., Rouse, B.N., Steere, A.C., Picker, L.J., Meijer, C.J. (1988) Butcher EC. High endothelial differentiation in human lymphoid and inflammatory tissues defined by monoclonal antibody HECA-452. *American Journal of Pathology* 130:147–155.

Fan, J.Q., Lee, Y.C. (1997) Detailed studies on substrate structure requirements of glycoamidases A and F. *The Journal of Biological Chemistry* 272:27058–27064.

Finn, M.G., Fokin, V.V. (2010) Click chemistry: function follows form. *Chemical Society Reviews* 39:1231–1232.

Gagneux, P., Varki, A. (1999) Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology* 9, 747–755.

Glavač D. (2015) Sinteza biološki značajnih hibrida dušikovih heterocikla i derivata 1,2,3,-triazola. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb.

Griffith, C.M., Sanders, E.J. (1991) Changes in glycoconjugate expression during early chick embryo development: A lectin-binding study. *The Anatomical Record* 231:238–250.

Griffith, C.M., Wiley, M.J. (1989) The distribution of cell surface glycoconjugates during mouse secondary neurulation. *Anatomy and Embryology* 180:567–575.

- Gupta, S.K., Bansal, P., Ganguly, A., Bhandari, B., Chakrabarti, K. (2009) Human zona pellucida glycoproteins: Functional relevance during fertilization. *Journal of Reproductive Immunology* 83:50–55.
- Haltiwanger, R.S., Lowe, J.B. (2004) Role of glycosylation in development. *Annual Review of Biochemistry* 73:494-537.
- Hang, H.C., Bertozzi, C.R. (2001) Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Accounts of Chemical Research* 34:727–736.
- Hanson, S.R., Hsu, T.L., Weerapana, E., Kishikawa, K., Simon, G.M., Cravatt, B.F., Wong, C.H. (2007) Tailored glycoproteomics and glycan site mapping using saccharide-selective bioorthogonal probes. *Journal of the American Chemical Society* 129:7266–7267.
- Hart, G.W., Housley, M.P., Slawson, C. (2007) Cycling of *O*-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446:1017–1022.
- Hein, J.E., Fokin, V.V. (2010) Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: New reactivity of copper(I) acetylides. *Chemical Society Reviews* 39:1302–1315.
- Hemmerich, S., Butcher, E.C., Rosen, S.D. (1994) Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, an adhesion-blocking monoclonal antibody. *The Journal of Experimental Medicine* 180:2219-2226.
- Hemmerich, S., Rosen, S.D. (2000) Carbohydrate sulfotransferases in lymphocyte homing. *Glycobiology* 10:849–856.
- Hirabayashi, J. (2008) Concept, strategy and realization of lectin-based glycan profiling. *The Journal of Biochemistry* 144:139–147.
- Hirabayashi, J. (2004) Lectin-based structural glycomics: Glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconjugate Journal* 21:35–40.
- Hodgkinson, A.J., Carpenter, E.A., Smith, C.S., Molan, P.C., Prosser, C.G. (2007) Adhesion molecule expression in the bovine mammary gland. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115:205–215.
- Hong, V.; Steinmetz, N.F.; Manchester, M.; Finn, M.G. (2010) Labeling live cells by copper-catalyzed alkyne-azide click chemistry. *Bioconjugate Chemistry* 21, 1912–1916.
- Hong, V., Presolski, S.I., Ma, C., Finn, M.G. (2009) *Angewandte Chemie International Edition* 48:9879–9883.

- Hsu, T.L., Hanson, S.R., Kishikawa, K., Wang, S.K., Sawa, M., Wong, C.H. (2007) Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 104:2614–2619.
- Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., Suzuki, A. (1998) The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans. *The Journal of Biological Chemistry* 273(25):15866–15871.
- Ishiyama, I., Uhlenbruck, G. (1971) On the nature of the anti-dextran activity of the *Helix pomatia* “anti A” agglutinin. *Z Naturforsch B* 266:1198–1199.
- Jewett, J.C., Bertozzi, C.R. (2010) Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chemical Society Reviews* 39:1272–1279.
- Jewett, J.C., Sletten, E.M., Bertozzi, C.R. (2010) Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones. *Journal of the American Chemical Society* 132:3688–3690.
- Johns, B. A.; Weatherhead, J. G.; Allen, S. H.; Thmpson, J. B.; Garvey, E. P.; Foster, S. A. (2009) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19, 1802–1806.
- Jork, R., Schmitt, M., Lossner, B., Matthies, H. (1984) Dopamine stimulated L-fucose incorporation into brain proteins is related to an increase in fucokinase activity. *Biomed Biochim Acta* 43:261–270.
- Kaltgrad, E., Sen Gupta, S., Punna, S., Huang, C.Y., Chang, A., Wong, C.H., Finn, M.G., Blixt, O. (2007) Anti-carbohydrate antibodies elicited by polyvalent display on a viral scaffold. *ChemBioChem* 8:1455–1462.
- Kiessling, L.L., Pohl, N.L. (1996) Strength in numbers: Non-natural polyvalent carbohydrate derivatives. *Chemical Biology* 3:71–77.
- Kiick, K.L.; Saxon, E.; Tirrell, D.A.; Bertozzi, C.R. (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 99, 19–24.
- Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. (2001) Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition* 40, 2004–2021.

Kolb, H.C., Sharpless, K.B. (2003) The growing impact of click chemistry on drug discovery *Drug Discovery Today*. 8:1128–1137.

Kosa RE, Brossmer R, Gross HJ (1993) Modification of cell surfaces by enzymatic introduction of special sialic acid analogues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 190:914–920.

Lauc, G., Krištić, J., Zoldoš, V. (2014) Glycans - the third revolution in evolution. *Frontiers in Genetics* 5, 1–7.

Lauc, G., Vojta, A., Zoldoš, V. (2014) Epigenetic regulation of glycosylation is the quantum mechanics of biology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840, 65–70.

Lauc, G., Zoldoš, V. (2010) Protein glycosylation-an evolutionary crossroad between genes and environment. *Molecular BioSystems* 2373–9.

Laughlin, S.T., Baskin, J.M., Amacher, S.L., Bertozzi, C.R. (2008) In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish. *Science* 320:664–667.

Laughlin, S.T., Bertozzi, C.R. (2009) In vivo imaging of *Caenorhabditis elegans* glycans. *ACS Chemical Biology* 4:1068–1072.

Laughlin, S.T., Bertozzi, C.R. (2007) Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization via Staudinger ligation. *Nature Protocols* 2:2930–2944.

Lee, R.T., Lauc, G., Lee, Y.C. (2005) Glycoproteomics: protein modifications for versatile functions. *EMBO Reports* 6:1018-22.

Lehmann, F., Tiralongo, E., Tiralongo, J. (2006) Sialic acid-specific lectins: Occurrence, specificity and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:1331–1354.

Lemieux, G.A., De Graffenried, C.L., Bertozzi, C.R. (2003) A fluorogenic dye activated by the staudinger ligation. *Journal of the American Chemical Society* 125, 4708–4709.

Licha, K., Debus, N., Emig-Vollmer, S., Hofmann, B., Hasbach, M., Stibenz, D., Sydow, S., Schirner, M., Ebert, B., Petzelt, D., Bühner, C., Semmler, W., Tauber, R. (2005) Optical molecular imaging of lymph nodes using a targeted vascular contrast agent. *Journal of Biomedical Optics* 10:41205.

- Link, C.D., Ehrenfels, C.W., Wood, W.B. (1988) Mutant expression of male copulatory bursa surface markers in *Caenorhabditis elegans*. *Development* (Cambridge, U.K.) 103:485–495.
- Link, C.D., Silverman, M.A., Breen, M., Watt, K.E., Dames, S.A. (1992) Characterization of *Caenorhabditis elegans* lectin-binding mutants. *Genetics* 131:867–881.
- Lizzi, A.R., D'Alessandro, A.M., Bozzi, A., Cinque, B., Oratore, A., D'Andrea, G. (2007) Pattern expression of glycan residues in AZT-treated K562 cells analyzed by lectin cytochemistry. *Molecular and Cellular Biochemistry* 300:29–37.
- Luchansky, S.J., Argade, S., Hayes, B.K., Bertozzi, C.R. (2004) Metabolic functionalization of recombinant glycoproteins. *Biochemistry* 43:12358–12366.
- Luchansky, S.J., Goon, S., Bertozzi, C.R. (2004) Expanding the diversity of unnatural cell-surface sialic acids. *ChemBioChem* 5:371–374.
- Lutz, J-F. (2007) 1,3-Dipolar Cycloadditions of Azides and Alkynes: A Universal Ligation Tool in Polymer and Materials Science *Angewandte Chemie International Edition* 46:1018–1025.
- Lutz, J.-F.; Zarafshani Z. (2008) Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne "click" chemistry. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 958–970.
- Ma, B., Simala-Grant, J.L., Taylor, D.E. (2006) Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology* 16:158R–184R.
- Marth, J.D., Grewal, P.K. (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nature Reviews Immunology* 8:874-87.
- Meldal, M., Tornøe, C.W. (2008) Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chemical Reviews* 108:2952–3015.
- Michie, S.A., Streeter, P.R., Bolt, P.A., Butcher, E.C., Picker, L.J. (1993) The human peripheral lymph node vascular addressin. An inducible endothelial antigen involved in lymphocyte homing. *American Journal of Pathology* 143:1688-1698.
- Moses, J.E., Moorhouse, A.D. (2007) The growing applications of click chemistry. *Chemical Society Reviews* 36:1249–1262.

- Mrkoci, K., Kelm, S., Crocker, P.R., Schauer, R., Berger, E.G. (1996) Constitutively hyposialylated human T-lymphocyte clones in the Tn-syndrome: Binding characteristics of plant and animal lectins. *Glycoconjugate Journal* 13:567–573.
- Murrey, H.E., Hsieh-Wilson, L.C. (2008) The chemical neurobiology of carbohydrates. *Chemical Reviews* 108:1708–1731.
- Neves, A.A., Stockmann, H., Harmston, R.R., Pryor, H.J., Alam, I.S., Ireland-Zecchini, H., Lewis, D.Y., Lyons, S.K., Leeper, F.J., Brindle, K.M. (2011) Imaging sialylated tumor cell glycans in vivo. *The FASEB Journal* 25:2528–2537
- Ning, X., Guo, J., Wolfert, M.A., Boons, G.J. (2008) Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions. *Angewandte Chemie International Edition* 47:2253–2255.
- Ohba, H., Bakalova, R. (2003) Relationships between degree of binding, cytotoxicity and cytoagglutinating activity of plant-derived agglutinins in normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 51:451–458.
- Onrust, S.V., Hartl, P.M., Rosen, S.D., Hanahan, D. (1996) Modulation of L-selectin ligand expression during an immune response accompanying tumorigenesis in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation* 97:54–64.
- Paessens, L.C., Garcia-Vallejo, J.J., Fernandes, R.J., van Kooyk, Y. (2007) The glycosylation of thymic microenvironments. A microscopic study using plant lectins. *Immunology Letters* 110:65–73.
- Pereira, M.E., Kisailus, E.C., Gruezo, F., Kabat, E.A. (1978) Immunochemical studies on the combining site of the blood group H-specific lectin 1 from *Ulex europaeus* seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 185:108–115.
- Pilobello, K.T., Mahal, L.K. (2007) Lectin microarrays for glycoprotein analysis. *Methods in Molecular Biology* 385:193–203.
- Poloukhine, A.A., Mbua, N.E., Wolfert, M.A., Boons, G.J., Popik, V.V. (2009) Selective labeling of living cells by a photo-triggered click reaction. *Journal of the American Chemical Society* 131:15769–15776.
- Prescher, J.A., Bertozzi, C.R. (2005) Chemistry in living systems. *Nature Chemical Biology* 1:13–21.

- Prescher, J.A., Dube, D.H., Bertozzi, C.R. (2004) Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. *Nature* 430:873–877.
- Rabuka, D., Hubbard, S.C., Laughlin, S.T., Argade, S.P., Bertozzi, C.R. (2006) A chemical reporter strategy to probe glycoprotein fucosylation. *Journal of the American Chemical Society* 128:12078–12079.
- Reza, J.N., Ritter, M.A. (1994) Differential expression of adhesion molecules within the human thymus. *Developmental Immunology* 4:55–64.
- Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V., Sharpless, K.B. (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* 41:2596–2599.
- Rouhanifard, S.H.; Nordstrom, L.U.; Zheng, T.; Wu, P. (2013) Chemical probing of glycans in cells and organisms. *Chemical Society Reviews* 42, 4284–4296.
- Sawa, M., Hsu, T.-L., Itoh, T., Sugiyama, M., Hanson, S.R., Vogt, P.K., Wong, C.-H. (2006) Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 103:12371–12376.
- Saxon, E., Bertozzi, C.R. (2000) Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* 287:2007–2010.
- Schauer, R. (2000) Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate Journal* 17:485–499.
- Schultz, M.J.I., Swindall, A.F., Bellis, S.L. (2012) Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer and Metastasis Reviews* 31:501–518.
- Schwarz, R.E., Wojciechowicz, D.C., Picon, A.I., Schwarz, M.A., Paty, P.B. (1999) Wheatgerm agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. *British Journal of Cancer* 80:1754–1762.
- Severi, E., Hood, D.W., Thomas, G.H. (2007) Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology* 153:2817–2822.
- Sharon, N. (2007) Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *The Journal of Biological Chemistry* 282:2753–2764.
- Sinha, R.K., Yang, G., Alexander, C., Mage, R.G. (2006) De novo expression of MECA-79 glycoprotein-determinant on developing B lymphocytes in gut-associated lymphoid tissues. *Immunology* 119:461–469.

- Sletten, E.M., Bertozzi, C.R. (2009) Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angewandte Chemie International Edition* 48:6974–6998.
- Soriano del Amo, D., Wang, W., Jiang, H., Besanceney, C., Yan, A., Levy, M., Liu, Y., Marlow, F.L., Wu, P. (2010) Biocompatible copper(I) catalysts for in vivo imaging of glycans. *Journal of the American Chemical Society* 132:16893–16899.
- Staudinger, H., Meyer, J. (1919) Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate und Phosphinimine. *Helvetica Chimica Acta* 2 635.
- Streeter, P.R., Rouse, B.T., Butcher, E.C. (1988) Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *The Journal of Cell Biology* 107:1853–1862.
- Thurston, G., Baluk, P., Hirata, A., McDonald, D.M. (1996) Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. *American Journal of Physiology* 271:H2547–2562.
- Tian, E., Hagen, K.G. (2007) O-linked glycan expression during *Drosophila* development. *Glycobiology* 17:820–827.
- Toppila, S., Paavonen, T., Nieminen, M.S., Hayry, P., Renkonen, R. (1999) Endothelial L-selectin ligands are likely to recruit lymphocytes into rejecting human heart transplants. *American Journal of Pathology* 155:1303-1310
- Tornøe, C.W., Christensen, C., Meldal, M. (2002) The Journal of Organic Chemistry 67:3057–3064
Tornøe, C.W., Christensen, C., Meldal, M. (2002) Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of Organic Chemistry* 67:3057–3064.
- Truong, L.D., Phung, V.T., Yoshikawa, Y., Mattioli, C.A. (1988) Glycoconjugates in normal human kidney. A histochemical study using 13 biotinylated lectins. *Histochemistry* 90:51–60.
- van Kasteren, S.I., Kramer, H.B., Gamblin, D.P., Davis, B.G. (2007) *Nature Protocols*. 2:3185–3194.
- Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3(2):97-130.

Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. (2008) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor, New York.

Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R. i sur. (2009) *Essentials of Glycobiology*. 2. izdanje, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN: 9780879697709.

Varki, A., editor. (2009) *Essentials of glycobiology 2nd edition*. (USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Varki, N.M., Strobert, E., Dick, E.J., Jr, Benirschke, K., Varki, A. (2011) Biomedical differences between human and nonhuman hominids: potential roles for uniquely human aspects of sialic acid biology. *Annual Review of Biochemistry* 6:365–393.

Varki, N.M., Varki, A. (2007) Diversity in cell surface sialic acid presentations: Implications for biology and disease. *Laboratory Investigation* 87:851–857.

Varki, N.M., Varki, A. (2007) Diversity in cell surface sialic acid presentations: Implications for Vimr ER, Kalivoda KA, Deszo EL, Steenbergen SM. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:132–153.

Vocadlo, D.J., Hang, H.C., Kim, E.J., Hanover, J.A., Bertozzi, C.R. (2003) A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 100:9116–912180.

Wang, B., Brand-Miller, J. (2003) The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 57:1351–1369.

Wang, Z., Udeshi, N.D., Slawson, C., Compton, P.D., Sakabe, K., Cheung, W.D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hart, G.W. (2010) Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Science Signaling* 3(104):ra2.

Wu, P., Fokin, V.V. (2007) Catalytic azide-alkyne cycloaddition: Reactivity and applications. *Aldrichimica Acta* 40:7–17.

Yeh, J.C., Hiraoka, N., Petryniak, B., Nakayama, J., Ellies, L.G., Rabuka, D., Hindsgaul, O., Marth, J.D., Lowe, J.B., Fukuda, M. (2001) Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a Core1 extension beta 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Cell* 105:957-969

Yeh, J.C., Hiraoka, N., Petryniak, B., Nakayama, J., Ellies, L.G., Rabuka, D., Hindsgaul, O., Marth, J.D., Lowe, J.B., Fukuda, M. (1997) Novel sulfated lymphocyte homing receptors and their control by a Varki A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *The FASEB Journal* 11:248–255.

Young, R.D., Gealy, E.C., Liles, M., Caterson, B., Ralphs, J.R., Quantock, A.J. (2007) Keratan sulfate glycosaminoglycan and the association with collagen fibrils in rudimentary lamellae in the developing avian cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48:3083–3088.

Zeng, X., Andrade, C.S., Oliveira, M.L., Sun, X.-L. (2012) Carbohydrate-protein interactions and their biosensing applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402(10):3161–3176.

Zeng, D.; Zeglis, B.M.; Lewis, J.S.; Anderson, C.J. (2013) The Growing Impact of Bioorthogonal Click Chemistry on the Development of Radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine* 54, 829–832.