

Kele Péter

TÉZISPONTOK

Bioortogonálisan modulált fotoreszponzív rendszerek
kémiai biológiai alkalmazásokhoz

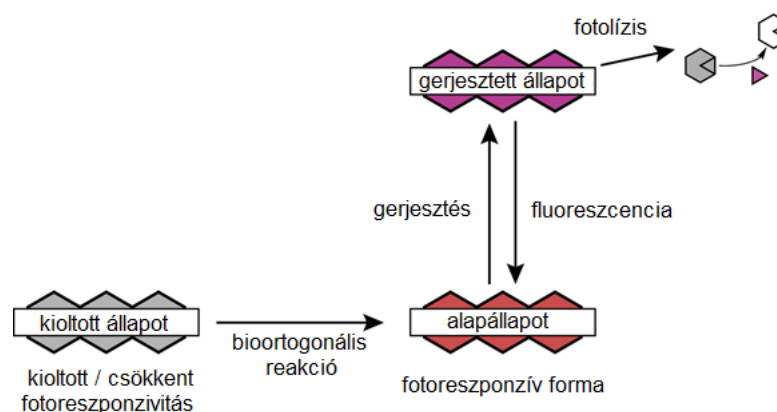
Bioorthogonally modulated photoresponsive systems for
chemical biology applications

című MTA doktori értekezéshez

Budapest, 2024. április

BEVEZETÉS

Mintegy 20 éves múltra tekinthet vissza a kémia- és a biológiateadományok közé ékelődő interdiszciplináris tudományterület, a kémiai biológia. A biokémiától eltérően, mely a biomolekulák kémiáját, szabályozását kutatja, ez a viszonylag fiatal határtudomány kémiai eszközöket alkalmaz a biológiai rendszerek vizsgálatára, kis szintetikus vegyületekkel való módosítások segítségével törekszik azok tanulmányozására, megértésére. A biológiai rendszereket felépítő molekulák vizsgálata eredeti, élősejtes környezetükben olyan kihívás, amely különösen kiemeli a kémiai biológia jelentőségét, hiszen eszköztárának segítségével lehetővé válik a kiválasztott biomolekulák szelektív, akár helyspecifikus módosítása is. Ebből a szempontból különösen jelentősek azok a szervezetidegen funkciós csoportok közt lejátszódó, nagy szelektivitású, hatékony biokompatibilis reakciók (*bioortogonális* reakciók), melyek lehetővé teszik az élő szervezetek biomolekuláinak szelektív, helyspecifikus módosítását. A kémiai biológiai manipulációk leggyakrabban alkalmazott módja a biomolekulák különféle markerekkel történő módosítása. A fluoreszcens markerek alkalmazásán alapuló szuperfelbontású mikroszkópiai módszerek robbanásszerű fejlődésének köszönhetően mára már a krio-elektronmikroszkópia felbontásához hasonló részletességgel vizsgálhatunk élő rendszereket. A jelzővegyületek mellett megnőtt az olyan, fényel eltávolítható védőcsoportok jelentősége is, melyek alkalmasak pl. kemoterápiás hatóanyagok aktivitását átmenetileg blokkolni. Kutatómunkánk során olyan bioortogonális funkciós csoporttal rendelkező fluoreszcens markerek és fényérzékeny védőcsoportok fejlesztésével foglalkoztunk, melyekre jellemző, hogy a specifikus, bioortogonális ligációs reakció során nyerik vissza addig tompított fotoreszponzivitásukat. Az értekezéshez 20 olyan közleményt választottam ki, melyek jól reprezentálják azt a tanulási folyamatot, amelynek során a jobb megértéssel betekintést nyerhettünk a bioortogonálisan modulált fotoreszponzív rendszerek világába. Az értekezés során végig többes szám első személyben tárgyalom az eredményeket ezzel is hangsúlyozva a kutatócsoportunkban zajló, együtt gondolkodáson alapuló csapatmunkát. A cikkek társszerzői kutatócsoportom egykori és jelenlegi tagjai vagy együttműködő partnereink. Mindannyian nagy segítségemre voltak az egyes kutatások tervezésében, kivitelezésében, az eredmények értelmezésében, illetve a közlemények megírásában, az ábrák elkészítésében.



BIOORTOGONÁLISAN AKTIVÁLHATÓ FLUOROGÉN MARKEREK

A biológiai rendszerek fluoreszcens mikroszkópiával való vizsgálata során figyelembe kell vennünk olyan a jel/zaj arányt csökkentő hatásokat, mint pl. az endogén fluorofórok emissziójából származó *autofluoreszcencia*, vagy a nem-specifikusan adszorbeálódott markerek *háttérfluoreszcenciája*. Sikeresen küszöbölhető ki az autofluoreszcencia, ha olyan fluoroforokat alkalmazunk, melyek a vörös/közeli infravörös (near infrared, NIR) tartományban gerjeszthetők. Ez azért is előnyös, mert a hosszabb hullámhosszú fényvel mélyebben elhelyezkedő biológiai struktúrák is tanulmányozhatók. Továbbá, a vörös tartományban kibocsátott fénynek nincs DNS-károsító hatása, így a citotoxicitás is jelentősen csökken. A háttérfluoreszcencia csökkentésére megoldást jelenthet olyan markerek alkalmazása, melyek a detektálás hullámhosszán nem, vagy csak alacsony intenzitással fluoreszkálnak, a specifikus ligációs reakciót követően viszont nagyságrendekkel megnő az emissziójuk intenzitása. Az ilyen jelzővegyületeket *fluorogén* jelzővegyületeknek nevezzük. A fluorogén vegyületek közül kiemelkedő fontosságúak az olyan *bioortogonális* funkciós csoporttal rendelkező származékok, melyekben maga a bioortogonális funkciós csoport a felelős a fluoreszcencia kioltásáért. Ezekre jellemző, hogy a specifikus, bioortogonális reakciót követően a tompító hatás megszűnik és a fluoreszcencia intenzitása akár több nagyságrenddel is növekszik. A bioortogonális funkcióscsoportok közül, megfelelő tervezés esetén hatékony tompító hatás érhető el az azid és a tetrazin motívummal különösen olyan kromoforok esetén, melyek a spektrum UV-kék-zöld tartományában emittálnak. Sajnos, a biológiai vizsgálatok szempontjából előnyösebb vörös tartomány felé haladva ez a kioltó hatás drámaian csökken. Kutatómunkánk jelentős részében olyan megoldások fejlesztésével foglalkoztunk munkatársaimmal, melyek lehetővé teszik a vörös tartományban emittáló, bioortogonálisan aktiválható fluoreszcens markerek fluorogenicitásának növelését. A kutatások korai szakaszában nagy Stokes-eltolódással rendelkező fluoreszcens vázak aziddal való modulálását tanulmányoztuk.[1] Vizsgálataink rámutattak a kromofor vázakhoz közvetlenül kapcsolódó azid funkciós csoport rotációján alapuló, emissziót

kioltó hatására, illetve igazoltuk e hatás limitációját.[2] Az eredmények folyományaként olyan új tervezési koncepciókat dolgoztunk ki, mint pl. a kétszeres fluorogenicitás vagy a közvetített fluorogenicitás, melyek segítségével számos esetben sikerült növelni a bioortogonális reakciót követő fluoreszcencia-serkentés (*fluorogenicitás*) értékét. A kétszeres fluorogenicitással rendelkező vegyületeknél vizsgáltuk a bioortogonális kioltó csoportok számának,[3-5] illetve a kioltómechanizmusok számának növelésének hatását.[6-8] Ez utóbbi általánosabban alkalmazható és jobb fluorogenicitással bíró markereket eredményezett. Vizsgáltuk a tetrazinnal kiváltható leghatékonyabb kioltómechanizmusok (kötésen keresztüli energiatranszfer, belső konverzió) limitációit fenoxazin és cianin vázakon.[9-11] A közvetített fluorogenicitáson alapuló markerek esetében pedig a kék tartományban emittáló kumarin kiváló fluorogenicitását alakítottuk át narancssárga és vörös fluorogenicitássá energiatranszfer segítségével.[12] Több ilyen javított fluorogenicitású markernél mutattuk meg, hogy alkalmasak szuperfelbontású mikroszkópiás (STED, STORM) vizsgálatokra is.

BIOORTOGONÁLIS REAGENSEK FEJLESZTÉSE

A fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálati módszerek fejlődésével lehetővé vált több biológiai képlet egyidejű szuperfelbontású vizsgálata, melyekhez elengedhetetlen több biomolekula, organelum stb. egyidejű szelektív jelölése élő sejtekben. Ezeket az igényeket kielégítendő terveztünk és állítottunk elő olyan új bioortogonális funkció csoportokat, melyek lehetővé teszik több, egymásra nézve is szelektív bioortogonális reakció egyidejű alkalmazását. E kutatások során azonosítottunk olyan új ciklooktin[13] vagy *transz*-ciklooktén származékokat, melyek csökkent hidrofób jellege jelentősen megkönnyíti az élő sejt jelölés körülményeit. Az egyik hidrofil TCO váz nem-természetes aminosav származéka ráadásul alkalmas volt fehérjékbe történő beépítésre a genetikai kód kiterjesztésének segítségével.[14] Vizsgáltuk továbbá különböző tégigényű tetrazinok inverz elektronigényű Diels-Alder reakcióit eltérő reaktivitású és tégigényű dienofilekkel szemben.[15] A fenti eredményeket számos esetben elméleti számolásokkal is igazoltuk együttműködés keretében. További kísérletek során igazoltuk, hogy a pironin váz alkalmas hullámhossz-váltó fluorogén vegyületek előállítására, illetve bizonyítottuk azidokkal szembeni kölcsönösen kizáró bioortogonalitását.[16] Nagy tégigényű izonitril csoporttal foglalkozó kutatások során ugyancsak bizonyítottuk, hogy különböző tégigényű tetrazinokkal szemben eltérő affinitást mutat, így alkalmas kettős bioortogonális jelölési eljárásokban való alkalmazásra. Sikerrel valósítottuk meg továbbá egy nagy tégigényű izonitril csoportot tartalmazó aminosav genetikai kódolását is.[17]

FELTÉTELESEN AKTIVÁLHATÓ FOTOLABILIS VÉDŐCSOPORTOK

Az elmúlt években egyre nagyobb a jelentősége az olyan kutatásoknak, melyek fénnel lehasítható vegyületek előállítását célozzák. Ezek a fotolabilis védőcsoportok lehetővé teszik pl. terápiás hatóanyagok fénnel történő felszabadítását, megnyitva ezzel az utat ún. fotoaktivált kemoterápiás eljárások felé, ahol a fény kiváló tér- és időbeli kontrollja mellett aktiválhatók a hatóanyagok. Ezekre a fotoaktiválható kemoterapeutikumokra jellemző, hogy a védőcsoporttal való módosítás során a gyógyszervegyület ideiglenesen elveszíti biológiai hatását. A tumor környezetébe juttatva, majd megfelelő hullámhosszú fénnel besugározva ezeket a konjugátumokat, a védőcsoport lehasadásával a gyógyszervegyület visszanyeri biológiai aktivitását. Jól lokalizálható tumorok esetében így megvalósítható a terápiás szerek lokális felszabadítása, a hatásuk ideiglenes blokkolása által pedig lehetséges a terápiás indexük javítása is. Más a helyzet szétszórtan elhelyezkedő, nem lokalizálható, többszörös tumorok esetében. Itt nem használhatjuk ki a fény kiváló térbeli kontrolláló tulajdonságát, hacsak nem sikerül elérnünk, hogy kizárólag a célsejtekhez (pl. tumorsejtek) specifikusan kapcsolódott védőcsoporttal ellátott hatóanyagok reagáljanak a fényre. Ennek lehetőségét vizsgáltuk meg, amikor a bioortogonálisan aktiválható fluorogén jelzővegyületek analógiájára bioortogonálisan aktiválható fényérzékeny védőcsoportokat akartunk előállítani. A tervezés során feltételeztük, hogy a fluoreszcencia és a fotodisszociáció ugyanabból a gerjesztett állapotból történik. A tervezés során felhasználtuk a kumarin típusú fényérzékeny védőcsoportok gerjesztési hullámhosszát befolyásoló tapasztalatainkat,[18] illetve a vinil tetrazin motívum segítségével megvalósítható, a gerjesztett állapot hatékony, belső konverzióval történő relaxációját eredményező hatását.[19] Az előállított, vinil tetrazinnal modulált kumarin típusú fotolabilis védőcsoporttal végzett kísérleteink során igazoltuk, hogy a tetrazin hatékony kioltásának köszönhetően a megfelelő hullámhosszú fénnel való besugárzás során nem történik meg a fotodisszociációs lépés.[20] A tetrazin Diels-Alder reakcióját követően viszont, a kioltómechanizmus megszűnése után kék-fénnel besugározva a vegyületeket, a fotoreszponzivitás visszanyerését követően megtörtént a modellvegyületek felszabadulása. Ezt a bioortogonális reakciótól függő feltételes fotoaktiválhatóságot élő sejtekben is bizonyítottuk, egy fluorogén vegyület felszabadításával.

Ezek az eredmények egy olyan új kutatási irány alapjait fektették le, mely segítségével megvalósítható a feltételesen fotoaktiválható kemoterápia. A klinikai transzlációhoz azonban szükséges olyan kihívások megoldása, mint a feltételes fotoaktiválhatóság hosszabb hullámhosszú fénnel aktiválható védőcsoportokra való átültetése, vagy a komplementer bioortogonális csoportok szelektív célbajuttatása, esetleg szelektív aktiválása a célsejtekben.

TÉZISPONTOK

Az értekezésben bemutatott eredményeken alapuló, tényszerű eredmények:

Bioortogonálisan aktiválható fluorogén markerek

1. Nagy Stokes eltolódással rendelkező aziddal modulált fluorogén vegyületek előállítása, az azid funkciós csoport kioltó hatásának elméleti kémiai igazolása és e hatás limitációjának felismerése. [1-2]
2. Két, fluoreszcencia kioltására alkalmas bioortogonális funkciós csoportot (azid/tetrazin) tartalmazó kettős fluorogén jelzővegyületek előállítása, vizsgálata. [3-5]
3. Két, egymástól függő, vagy független kioltómechanizmuson alapuló, kettősen fluorogén rendszerek előállítása és alkalmazása. [6-8]
4. A tetrazinnal kiváltható kioltómechanizmusok vizsgálata (kötésen keresztüli energiáttranszfer, belső konverzió) fenoxazin és cianin vázakon. [9-11]
5. A közvetített fluorogenicitás koncepciójának kidolgozása és tanulmányozása fluorogén diádokon. [12]

Bioortogonális reagensek fejlesztése

6. Csökkent hidrofobicitással rendelkező, monobenzociklooptin reagens (COMBO) előállítása és vizsgálata. [13]
7. Egy hidrofíl transz-cikloopténnal (DOTCO) módosított nem természetes aminosav előállítása és genetikai kódolása. A hidrofíl aminosav egyszerű, gyors mosással való eltávolításának igazolása. [14]
8. Szerkezet-hatás vizsgálatok segítségével a sztérikus és elektronikus hatások vizsgálata nikotinamidból levezethető tetrazinokon. [15]
9. A pironin váznak, mint bioortogonális funkciós csoportnak az alkalmazása kölcsönösen ortogonális bioortogonális reakciókban, illetve olyan olyan új, hullámhossz-változtató fluorogének előállítása, ahol a pironin váz bioortogonális reakciója a π -rendszer kiterjesztését eredményezi. [16]
10. Nagy térigényű izonitril csoporttal módosított nem-természetes aminosav (BICK) genetikai kódolása, az izonitril csoport kölcsönösen kizáró bioortogonális reakciókban való alkalmazása. [17]

Feltételesen aktiválható fotolabilis védőcsoportok

11. Kumarin típusú fotolabilis védőcsoportok aktiválási hullámhosszának vörös-irányú módosítása a π -elektronrendszer kiterjesztésével. [18]
12. 488 nm-es gerjesztést lehetővé tevő ultrafluorogén, vinil tetrazinnal módosított kumarin előállítása. [19]
13. Feltételesen aktiválható fotolabilis védőcsoportok koncepciójának kidolgozása, az elmélet igazolása vinil tetrazinnal modulált kumarinalapú fotolabilis védőcsoport segítségével, élő sejtekben. [20]

A tézisek alapjául szolgáló közlemények:

- [1] A. Herner, I. Nikić, M. Kállay, E. A. Lemke, P. Kele, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3297. <https://doi.org/10.1039/C3OB40296G>
- [2] A. Herner, G. E. Girona, I. Nikić, M. Kállay, E. A. Lemke, P. Kele, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1370. <https://doi.org/10.1021/bc500235p>
- [3] O. Demeter, E. A. Fodor, M. Kállay, G. Mező, K. Németh, P. T. Szabó, P. Kele, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 6382. <https://doi.org/10.1002/chem.201504939>
- [4] O. Demeter, A. Kormos, C. Koehler, G. Mező, K. Németh, E. Kozma, L. B. Takács, E. A. Lemke, P. Kele, *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 1552. <https://DOI:10.1021/acs.bioconjchem.7b00178>
- [5] A. Kormos, C. Koehler, E. A. Fodor, Z. R. Rutkai, M. E. Martin, G. Mező, E. A. Lemke, P. Kele, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 8841. <https://doi.org/10.1002/chem.201800910>
- [6] E. Kozma, G. Estrada Girona, G. Paci, E. A. Lemke, P. Kele, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6696. <https://doi.org/10.1039/C7CC02212C>
- [7] A. Kormos, D. Kern, A. Egyed, B. Söveges, K. Németh, P. Kele, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 5425. <https://doi.org/10.1039/D0CC01512A>
- [8] A. Kormos, A. Egyed, J. M. Olvany, Á. Szatmári, A. Biró, Zs. Csorba, P. Kele, K. Németh, *Chemosensors* **2022**, *10*, 37. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10010037>
- [9] G. Knorr, E. Kozma, A. Herner, E. A. Lemke, P. Kele, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 8972. <https://doi.org/10.1002/chem.201600590>
- [10] G. Knorr, E. Kozma, J. M. Schaart, K. Németh, Gy. Török, P. Kele, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 1312. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00061>

- [11] E. Albitz, K. Németh, G. Knorr, P. Kele, *Org. Biomol. Chem.* **2023**, *21*, 7358. <https://doi.org/10.1039/D3OB01204B>
- [12] E. Albitz, D. Kern, A. Kormos, M. Bojtár, G. Török, A. Biró, Á. Szatmári, K. Németh, P. Kele, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202111855. <https://doi.org/10.1002/anie.202111855>
- [13] B. R. Varga, M. Kállay, K. Hegyi, S. Béni, P. Kele, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 822. <https://doi.org/10.1002/chem.201102329>
- [14] E. Kozma, I. Nikić, B. R. Varga, I. V. Aramburu, J. H. Kang, O. T. Fackler, E. A. Lemke, P. Kele, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1518. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600284>
- [15] G. B. Cserép, O. Demeter, E. Bätzner, M. Kállay, H-A. Wagenknecht, P. Kele, *Synthesis* **2015**, *47*, 2738. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1380721>
- [16] G. B. Cserép, K. Németh, Á. Szatmári, F. Horváth, T. Imre, K. Németh, P. Kele, *Synthesis* **2022**, *54*, A. <https://doi.org/10.1055/a-1761-4672>
- [17] Á. Szatmári, G. B. Cserép, T. Á. Molnár, B. Söveges, A. Biró, G. Várady, E. Szabó, K. Németh, P. Kele, *Molecules* **2021**, *26*, 4988. <https://doi.org/10.3390/molecules26164988>
- [18] M. Bojtár, A. Kormos, K. Kis-Petik, M. Kellermayer, P. Kele, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 9410. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b03624>
- [19] E. Németh, G. Knorr, K. Németh, P. Kele, *Biomolecules* **2020**, *20*, 397. <https://doi.org/10.3390/biom10030397>
- [20] M. Bojtár, K. Németh, F. Domahidy, G. Knorr, A. Verkman, M. Kállay, P. Kele, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15164. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c07508>

Az értekezésben nem, vagy nem részletesen tárgyalt, a témához szorosabban kapcsolódó egyéb közlemények:

Meghívásos összefoglaló, kitekintő művek:

- E. Kozma, P. Kele *Top. Curr. Chem.* **2024**, *382*, 7. <https://doi.org/10.1007/s41061-024-00452-1>
- E. Kozma, M. Bojtár, P. Kele, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202303198. <https://doi.org/10.1002/anie.202303198>
- E. Kozma, P. Kele, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 215. <https://doi.org/10.1039/C8OB02711K>

- E. Kozma, O. Demeter, P. Kele, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 486-501. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600607>
- G. B. Cserép, A. Herner, P. Kele, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3(4)*, 042001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/3/4/042001>

Vörös tartományban gerjeszthető xanténium alapú fotolabilis védőcsoportok

- Egyed, K. Németh, T. Á. Molnár, M. Kállay, P. Kele, M. Bojtár, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 4026. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c11499>

Fluoreszcens COMBO származék

- M. C. Huber, A. Schreiber, P. von Olshausen, B. R. Varga, O. Kretz, B. Joch, S. Barnert, R. Schubert, S. Eimer, P. Kele, S. M. Schiller, *Nat. Mater.* **2015**, *14*, 125. <https://doi.org/10.1038/nmat4118>

Nikotinsavból származtatott tetrazin-nukleotid és fluoreszcens COMBO

- M. Merkel, S. Arndt, D. Ploschik, G. B. Cserép, U. Wenge, P. Kele, H-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 7527. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b01205>

Bisz-COMBO keresztkapcsoló linker

- R. B. Quast, B. Ballion, M. Stech, A. Sonnabend, B. R. Varga, D. A. Wüstenhagen, P. Kele, S. M. Schiller, S. Kubick, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34048. <https://doi.org/10.1038/srep34048>

COMBO-nukleotid

- C. Stubinitzky, G. B. Cserép, E. Bätzner, P. Kele, H-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11218. <https://doi.org/10.1039/C4CC02855D>