



MTA–HUN-REN RCNS Lendület "Momentum" Chemical Biology Research Group
HUN-REN RESEARCH CENTRE FOR NATURAL SCIENCES
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY
PÉTER KELE
Head of Research Group
Address: Magyar tudósok krt 2. H-1117, Budapest, Hungary
Tel.: +36 1 382 6986
E-MAIL: KELE.PETER@TTK.HU; WEB: <http://chembiol.ttk.hu>



VÁLASZOK MARTINEK TAMÁS BÍRÁLATÁRA

Köszönöm Bírálónak a dolgozatomra adott pozitív értékelését az értekezésben szereplő eredmények elismerését, valamint gondolatébresztő kérdéseit melyekre az alábbiakban válaszolok. Köszönöm, és elfogadom a bírálónak a dolgozattal kapcsolatos kritikai megjegyzéseit.

p5, kémiai biológia definíciója: Bár a kémiai biológia leggyakrabban kis molekulákat használ a biológiai rendszerek manipulálására, ez nem kizárólagosan van így. A terület meghatározása véleményem szerint ennél tágabb. A kémiai biológia továbbra is megkülönböztethető azáltal, hogy kémiai eszközök alkalmazására összpontosít a biológiai kérdések megválaszolásának érdekében.

Egyetértek a Bíráló megjegyzésével. Megfogalmazásom túlságosan is korlátozó, a kis molekulákkal történő kémiai módosítások ugyanis a kémiai biológia eszköztárának valóban az egyik leggyakrabban alkalmazott, de nem kizárólagos eleme.

p14, Mennyire tehető elviekben specifikussá a bisz-tetrazin származék fehérje jelölése azzal, hogy optimaljuk a mesterséges aminosavak pozícióját a célfehérjében?

A tetrazin-ciklooktin reakció már önmagában is nagyon specifikus, a bisz-származékok itt a jobb fluorogenicitás elérését szolgálták. Az azonban nagyon fontos, hogy a két nem-természetes, ciklooktinnal (BCN) módosított aminosav térben egymáshoz viszonyított pozíciója milyen mértékben képezi le a jelzővegyület két tetrazin csoportjának távolságát. Ezt a kérdést a bisz-azid származékokon tanulmányoztuk behatóbban, és az ottani tapasztalatok alapján választottuk ki a cél-peptidszekvenciákat. a bisz-tetrazin-vegyületekhez. Az alábbi megfigyeléseket tettük:

- A peptidszekvencia hosszától függetlenül, minden esetben az 1:1 arányú adduktot kaptuk. Ezt azzal magyaráztuk, hogy az egyszerűen reagált biszazidok sokkal reaktívabbak a második reakcióban (pl. elő sem lehetett állítani a mono-BCN származékokat még nagy biszazid : BCN arányok esetén sem), illetve azt sem szabad elfelejteni, hogy a második klikk-lépés már intramolekulárisan játszódik le. Természetesen irreálisan közeli pozicionálás esetén nem vizsgáltuk a kötődést.
- A két BCN funkció peptidekben lévő távolsága leginkább a fluorogenicitás mértékére volt hatással. Konformációanalízisre vonatkozó számítások rávilágítottak arra, hogy e különbségek a keletkező ciklikus adduktban lévő kromofor planaritásával magyarázható.
- A vizsgált peptidszekvenciákat különféle biszarzén jelzővegyületekre optimalizált irodalmi példák alapján vettük, mi magunk nem foglalkoztunk ezzel, mivel nem rendelkezünk a szükséges screening technológiával. Megjegyzem, hogy ha rendelkezésre állt volna akkor az AlphaFold, valószínűleg éltünk volna a mesterséges intelligencia által adott lehetőséggel.

A válasz a kérdésre tehát az, hogy bár a specifikusság nem, a fluorogenicitás mértéke további optimalizációval valószínűleg tovább növelhető.

p16, Fig. 4, Feltételezhetően a vegyületek számai vannak az ábrán, a szövegben nincs hozzárendelés.

Igen, az ábra az eredeti publikációból lett átemelve és nem fordítottam elég figyelmet az ábra és a szöveg harmonizációjára, ezért elnézést kérek.



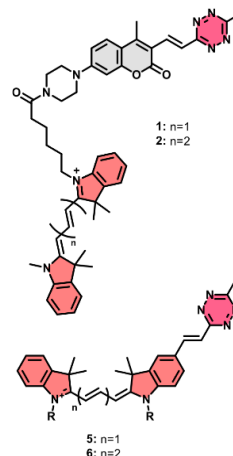
p16, A DNS interkalátorok esetében kimutatott konszekutív fluoreszcencia aktiválás nagyon érdekes jelenség. A kölcsönhatások sorrendje befolyásolja-e a reaktivításokat? Logikai ÉS műveletként történő alkalmazáshoz a független reakciókészség szükséges lenne.

Teljesen jogos a bíráló felvetése. Sajnos nem tanulmányoztuk, hogy a jelzővegyület DNS-hez kötődése hogyan befolyásolja a klikk-reaktivitást. Véleményem szerint, amennyiben befolyásolja, annak a sztérikus gátlás az oka. Mindazonáltal, a sejtes környezetben nem áll módunkban annak szabályozása, hogy melyik biopolimerrel, a fehérjével vagy a DNS-sel lépjen-e előbb kölcsönhatásba, ezért nem volt indokolt ennek tanulmányozása. A logikai ÉS kapcsolóként való definiálás e tanulmányok hiányában azonban valóban túlzó.

p18, A FRET-alapú fluorogén konstrukcióban a 16x-os növekmény mihez képest értendő? A tetrazinnal közvetlenül csillapított Cy3-hoz képest? Milyen képelemzési statisztikával kvantitálták a háttér szignál relatív nagyságát?

A dolgozat 7. ábráján látható **1** vegyület 16x fluoreszcencia növekménye (fluorogenicitás) a festék klikk-termékének és tetrazin formájának fluoreszcencia intenzitás hányadosaként értelmezendő ($I_{\text{klikk}} / I_{\text{Tz}}$). Az összehasonlítás alapjaként szolgáló, a bíráló által helyesen értelmezett, tetrazinnal közvetlenül modulált Cy3 festék (az ábrán az **5** vegyület) ugyanilyen alapon vett fluorogenicitása 6x.

A háttérszignál nagyságát nem kvantifikáltuk, olyan kvalitatív különbségek, mint a célfehérje területén kívül megfigyelhető jel állapítottuk meg, hogy a jobb fluorogenicitással alacsonyabb háttérszignált értünk el.



p18, Milyen mértékben voltak vízdékonyak a tetrazin-kumarin-Cy3/Cy5 triádok? Nem tapasztaltak-e kicsapódási jelenségeket. Lehetséges ezzel magyarázni a sejtmaggal nem kolokalizálódó festést?

Az alkalmazott 1 μ M-os koncentrációban nem figyeltünk meg oldhatósági problémára utaló kicsapódást. A cianin típusú festékek valóban hajlamosak DNS-hez asszociálódni, eközben a fluoreszcencia intenzitás is némileg növekedhet. Az, hogy esetünkben nem figyeltük meg ezt, annak köszönhető, hogy a bioortogonalizált Lamin fehérjével való kémiai reakció sokkal hatásosabb, kovalens jelölést és jelentősebb fluoreszcencia-intenzitás növekedést tesz lehetővé. Így, ha történt is DNS-Cy3 vagy DNS-Cy5 kötődés a sokkal intenzívebb fehérjelölés mellett ez nem látszott.

p24, A Lys(ϵ -N-DOTCO) jelentősen hidrofílebb, és nagyságrendekkel gyorsabban volt kimosható a citoplazmából. Ehhez hatékonyan kellett diffundálnia a sejtmembránon, ami igényli az anyag bizonyos mértékű (optimális) hidrofóbicitását. Lehetséges, hogy efflux pumpák is segítették a kimosási kísérleteket?

Arról nincs tudomásom, hogy vizsgálta-e valaki a nem-természetes aminosavszármazékok membránon-keresztüli transzportfolyamatait, így nem zárható ki annak lehetősége, hogy efflux pumpák is részt vesznek a kiürülésben. Ez viszont a többi nem-természetes aminosavra is igaz. Bár a Lys(ϵ -N-DOTCO) valóban nagyságrendekkel hidrofílebb, mint a többi feszültgyűrűs rendszerrel módosított nem-természetes



aminosav, ez csak ebben az összehasonlításban igaz. Véleményem szerint a Lys(ϵ -N-DOTCO) olyan ideális polaritást képvisel, mely összességében lehetővé teszi, hogy kevésbé legyen hajlamos a nem-specifikus adszorpcióra és így már kevés mosási lépéssel is eltávolítható legyen a citoszólból.

p31, Fig 16, a tBuTetCy3 esetén foltos, aspecifikus festések látszódnak a CLMS képeken.
Aggregáció magyarázhatja ezt?

Az itt alkalmazott, kölcsönösen ortogonális-bioortogonális reakciók sebessége közti egy nagyságrendnyi különbség ($k_2 = \sim 10^0$ vs. $\sim 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) miatt a tBuTetCy3 vegyületet nagyobb koncentrációban és hosszabb ideig volt szükséges alkalmazni (100 μM , 16h vs. 3 μM , 1h). Ennek köszönhetően valószínűleg az aggregáció (a cianin festékek hajlamosak erre), és az aggregátumoknak fagocitózissal történő felvétele játszhatott szerepet abban, hogy az amúgy nem permeábilis festék megjelenik az intracelluláris térben. A hosszabb jelölési koncentráció ezen kívül lehetőséget teremt arra is, hogy a jelölt receptorok a természetes internalizációs folyamatok következtében megjelenjenek az endocitotikus vezikulumokban.

Élő sejteknél gyakori a fluoreszcens fehérjékkel fuzionálva történő expresszió, ami nem igényli a pótlólagos kémiai jelölést. Milyen esetekben jelent kifejezett előnyt az élő sejt tanulmányozásánál a genetikailag nem kódolt aminosav beépítése és a kémiai jelölés?

A kérdésre a bevett válasz, hogy a nem-természetes aminosavak genetikai kódolásával és poszt-transzlációs bioortogonális jelölésével sokkal kisebb perturbációt idézünk elő funkció, szerkezet, mozgékonyság tekintetében, mint a célfehérje méretével összeegyeztethető méretű fúziós fehérjével való jelöléssel. További előnyként szokták említeni a szerves fluoroforoknak a fluoreszcens fehérjékénél sokszor előnyösebb fotofizikai tulajdonságait. Ezeket az előnyöket azonban sokan vitatták, cáfolták, ráadásul a jelölési eljárás természetéből fakadóan a kismolekulás jelölés során általában problémát jelent a háttérfluoreszcencia. Lemke és munkatársai behatóan vizsgálták ezt a kérdést egy 26 tagú fehérjetáron. Megállapították, hogy a vizsgált fehérjék közül mindössze 6 esetében volt megfigyelhető a fúziós fehérje jelenlétéből fakadó strukturális változás. Tehát ennél a 6 fehérjénél biztosan előnyösebb a genetikailag kódolt aminosav beépítése és utólagos jelölése (<https://doi.org/10.1021/acsnano.5b04434>). Nikic és munkatársai feszültségfüggő Na-csatornák módosítási lehetőségeit vizsgálták. Megállapították, hogy a fúziós fehérjével történt jelölés nagymértékben befolyásolta a csatornafehérjék asszociációs képességét, így ebben az esetben is a bioortogonális megközelítés az előnyös (<https://doi.org/10.1242/jcs.260600>; <https://doi.org/10.1038/s41467-022-27956-y>).

A kérdés azonban napjainkban felettébb időszerű lett és a mérlegelés alapja is megváltozott, ugyanis a szuperfelbontású mikroszkópiás módszerek a közelmúltban érték el azt a feloldóképességet, ahol már kritikus a két módszer különbségéből adódó ún. linkage-error (a detektálható jel forrása és a jelölt fehérje közti távolság). A Hell és munkatársai által kifejlesztett MINFLUX és MINSTED nanoszkópiás vizsgálati módszerekkel akár 2 nm-es felbontóképesség is elérhető, ami összemérhető pl. a fluoreszcens és egyéb fúziós jelzőfehérjék méretével (2-5 nm) (<https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00746>). E fejlesztéseknek köszönhetően a kiválasztandó jelölési eljárás tehát nagyon függ attól, hogy finom szerkezeti részletek meghatározása, vagy a célfehérjék azonosítása, követése-e a cél.

Milyen koncentrációkban kellett alkalmazni az élősejtes festéseknél az anyagokat?

A jelöléseknél alkalmazható jelzővegyület-koncentráció nagymértékben függ az alkalmazott bioortogonális reakció sebességétől. Az általunk leggyakrabban alkalmazott tetrazin – transz-ciklooktén / ciklooktin és azid-ciklooktin bioortogonális jelölési eljárások során rendre 0,1 - 3 μM és 10 - 100 μM os jelzővegyület-koncentrációkat igényeltek.



MTA–HUN-REN RCNS Lendület "Momentum" Chemical Biology Research Group
HUN-REN RESEARCH CENTRE FOR NATURAL SCIENCES
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY
PÉTER KELE
Head of Research Group
Address: Magyar tudósok krt 2. H-1117, Budapest, Hungary
Tel.: +36 1 382 6986
E-MAIL: KELE.PETER@TTK.HU; WEB: <http://chembiol.ttk.hu>



A gerjesztési/emissziós maximum és a kötéshasadási hullámhossz eltolása az IR/NIR felé a jellemzően hidrofób π -elektronrendszer méretének növelését igényli. Ezzel a molekulák hidrofób felszíne is jelentősen növekszik, ami növelheti az aspecifikus kötődési jelenségek valószínűségét. Eközben a detektálhatóság csak a specifikus ligálási reakciók után valósul meg. Milyen kockázatokat rejthet ez az aspecifikus és nem fluoreszcens fehérjekötés, esetleg membrán felhalmozódás az élő rendszerekben nemkívánt hatások szempontjából? Mit mutattak a toxicitási mérések?

Igen ezek teljesen jogos felvetések. Szerencsére az alkalmazott bioortogonális reakció lehetővé teszi az alacsony jelölési koncentrációt ($<1 \mu\text{M}$). A vegyületeink membránokban való felhalmozódása valóban eredményezheti azok instabilitását így a sejtek életképességére is hatással lehetnek. Az általunk előállított jelzővegyületek toxicitását minden esetben meghatároztuk (MTT teszt), ezek kevés kivétellel azt mutatják, hogy az alkalmazott fluoreszcens vázak és módosítások csak magasabb, néhány esetben $10 \mu\text{M}$, de leggyakrabban $100 \mu\text{M}$ koncentráció felett idézi elő a sejtek életképességének csökkenését.

Budapest, 2025. április 4.

Kele Péter