



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 POPPE LÁSZLÓ BÍRÁLATÁRA

Köszönöm Bírálónak a dolgozatomra adott pozitív értékelését, az értekezésben szereplő eredmények elismerését, valamint a kérdéseket, melyek megválaszolása lehetővé teszi egyes nehezebben követhető részek részletesebb kifejtését. Köszönöm, és részben elfogadom a bírálónak a dolgozat kivitelezésével kapcsolatos kritikai megjegyzéseit.

A fejezetcímben is alkalmazott „activatable” kifejezés a Merriam Webster szótár szerint nem létezik; helyette alkalmazható az „activable”

Igaz, hogy az „activatable” szó nem szerepel a szótárakban, ott kizárólag az „activable” található. Azonban a kutatási területtel kapcsolatos angol nyelvű szakirodalomban szinte kizárólag az „activatable” van használatban. Ennek oka, hogy a szóban forgó képesség az „activate”-re, mint igére (cselekvésre) és nem pedig az „active”-ra, mint jelzőre (állapotra) vonatkozik.

A „Bioorthogonal chemistry” (5. oldal) részben (és később több helyen is) használt „live organism”/„live system” helyett jobb lenne a „living organism”/„living system” alkalmazása.

A „living” valóban gyakrabban használt ebben a kontextusban. Bár mind a „live”, mind a „living” melléknév (a „living”-nek ezen kívül van még főnévi jelentése is), ugyanazzal a jelentéssel, árnyalatnyi különbség valóban van a két szó tartalmában. Míg a „live” kizárólag arra utal, hogy a jelzett alany életben van, a „living” olyan konnotációval is bír, hogy ezen kívül további, az élethez köthető funkcióval is rendelkezik. Így használatuk nagyban függ attól, mit akarunk kihangsúlyozni pl. live music, live meeting. Véleményem szerint a live organism / living organism ebben a vonatkozásban ugyanarra utal, mivel azt kívántam jelezni, hogy életben levő sejteket vizsgáltunk. Összességében, szerencsésebb lett volna a bővített jelentéstartalommal rendelkező „living” alkalmazása.

Az értekezés ugyan tézisszerű, de ennek ellenére jó lett volna a nem triviális rövidítéseket mindenütt feloldani az első előfordulási helyen. Ráadásul ez nem konzekvensen történt, pl. a „super resolution microscopy (SRM)” vagy a „protein of interest (POI)” esetében a rövidítés feloldása megtörtént, míg a „BODIPY”. „FRET” vagy „TBET” rövidítéseknél nem. Ugyancsak erősen hiányzott a „GCE” rövidítés esetében a „genetic code expansion” feloldás (amit persze a kontextusból és az eredeti közleményekből ki lehetett következtetni).

Köszönöm az észrevételt, valóban helyesebb lett volna vagy az első elfordulásnál definiálni, esetleg rövidítésjegyzéket csatolni a dolgozathoz.

A kétszeresen azid funkciót tartalmazó fluorogén keresztkötők esetében mennyire volt várható a tényleges keresztkötés kialakítás biológiai releváns fehérjekoncentrációk esetén? Nem lehetett volna-e előre jelezni a problémát ilyen koncentrációtartományba eső proteinkoncentrációs előkísérletekkel?

A biszazid (és később bisztetrazin) típusú jelzővegyületek keresztkapcsolóként való alkalmazásakor célunk kizárólag annak bemutatása volt, hogy az ilyen bifunkciós vegyületek akár fluorogén keresztkötőkként is alkalmazhatók. Esetünkben in vitro körülmények közt vizsgáltuk ezt izolált, bioortogonalizált zöld fluoreszcens fehérje, GFP^{Y39-BCN} felhasználásával, a fehérjéhez képest kétszeres feleslegben vett jelzővegyület koncentráció esetén. Az adott körülmények közt a vizsgált bifunkciós keresztkötők eltérő hatékonysággal eredményezték a dimer terméket - az egyik esetben szinte kizárólag az keletkezett - így a koncentrációk mellett az alkalmazott vegyületek is jelentős hatással vannak a keresztkötés kialakításának hatékonyságára. Amennyiben sejtes környezetben sor kerül e biszazid/bisztetrazin vegyületek alkalmazására pl. biológiai releváns fehérjék közti kölcsönhatások in cellulo detektálásához



és irreverzibilissé tételéhez, mindenképpen szükséges az azt modellező környezetben előkísérleteket végezni, nemcsak a koncentrációra nézve, hogy lehetőség szerint a dimer termékek képződése felé toljuk el az arányt, hanem az adott fehérjepárhoz legjobban illeszkedő fluorogén biszazid/bisztetrazin azonosítása végett is. Továbbá azt is optimalizálni kell, hogy a két fehérje kölcsönhatásának irreverzibilissé tételéhez mely pozíciókba érdemes a ciklooktint bevinni.

A fluorogén molekulák és a linkerek jellemzően hidrofób karakterűek, ami számottevően módosíthatja biológiai rendszerekben eloszlásukat. Történtek-e kísérletek pl. a multikromoforikus rendszerek kialakítása során a linkerek hidrofilitásának növelésére (pl. alkil linker helyett cukoralapú vagy polietilén-oxi linker)? A hidrofilitás növelés fontosságát jelzi a későbbi kísérletek során a TCO kapcsolóelemek helyett a DOTCO módosítás sikere.

A fluorogén vegyületek témakörében nem tettünk erre irányuló erőfeszítéseket. Ennek oka, hogy az ilyen módosítások jelentősen befolyásolhatják a jelzővegyületek membránpermeabilitását. Az utolsó fejezetben ismertetett feltételeken fotoaktiválható kumarinszármazék esetében pl. egy polietilén-glikol rész beépítésével értük el, hogy az addig permeábilis vegyület impermeábilis legyen. A vizsgált rendszerek esetében nem jelentett gondot sem oldhatóság, sem a toxicitás, így ez az irány nem motivált bennünket. Ráadásul a bioortogonális reakciótól függő reaktivitás alapú fluorogenicitás pont azt hivatott kiküszöbölni, hogy az esetleges nem-specifikus adszorpcióból fakadó háttérfluoreszcenciát minimalizáljuk.

A pironin vázas reagensek esetében vizsgálták-e ezen vegyületek stabilitását az élő sejtekben potenciálisan előforduló karboxilészteráz/promiszkuus proteáz enzimbontással szemben is (pl. célsejt nyers extraktummal, vagy ismert mintaproteázok biológiai releváns koncentrációval)?

Mi magunk nem végeztünk erre irányuló vizsgálatokat, e témában kizárólag *in vitro* kísérleteket folytattunk. A 2-piron motívum azonban a természetben előforduló heterociklusok gyakori képviselője, amely megtalálható az élet szinte valamennyi területén, pl. baktériumokban, gombákban, tengeri szervezetekben, rovarokban, növényekben. Számos, természet által inspirált antibiotikum, antivirális és rákellenes szer fontos alkotóeleme is (<https://doi.org/10.1007/s41061-021-00350-w>). Gyakran találkozunk ezzel a struktúrával pl. a fluoreszcens jelzővegyületekként vagy fotolabilis védőcsoportként alkalmazott kumarinokban is, és sem mi, sem más nem tett olyan megfigyelést, hogy ezek sejten belüli vagy egyéb biológiai releváns közegben csökkent stabilitással rendelkeznének. Bár egy sor alkalmazásában a 2-piron-rész intakt állapotában vesz részt az általa előidézett hatás, pl. gátlás eléréséhez (<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.033>), az irodalomban találunk példát arra is, hogy pont a laktón hidrolízise adja az aktivitását (pl. koleszterin-észterázok - [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00304-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00304-1)). A kérdés viszont rávilágít annak fontosságára, hogy a 2-piron rész sejtes (esetleg még komplexebb) környezetben történő bioortogonális alkalmazása esetén behatóbban kell tanulmányozni a váz biológiai releváns közegben mutatott hidrolitikus stabilitását.

Biokompatibilis megközelítésként a biológiai rendszereken belüli szétszórt helyi fénygerjesztésre elképzelhető-e a fotolabilis rendszerek manipulálása biológiai fény-gerjesztéssel (pl. a Szentjánosbogár is világít). Van-e ilyen rendszerre irodalmi példa?

A fény a látható tartomány zöld-vörös illetve a közeli infravörös tartományban biokompatibilisnek tekinthető, inkább a fénynek a célterületre juttatása jelent kihívást.

Erre biológiai folyamatok (pl. luciferin-luciferáz) által produkált fényjelenségek első közelítésben alkalmasnak tűnhetnek, hiszen a jelenséget gyakran alkalmazzák pl. biológiai assay-kben önmagukban, vagy szerves fluoroforokkal együtt, pl. biolumineszcens rezonáns energiatranszfer (BRET) rendszerek részeként, melyek az adott alkalmazás szempontjából igen érzékeny kimutatást tesznek lehetővé, a



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>



gyakorlatilag zéró háttérnek köszönhetően. Találunk is az irodalomban biolumineszcencia által előidézett, BRET jelenséget kiaknázó fotokémiai reakciót (<https://doi.org/10.1021/jacs.0c11016>). Ezekben az esetekben azonban nem fotonemisszióról és abszorpcióról, hanem rezonáns, non-radiatív energiatranszferről van szó, ami megköveteli a biolumineszcens és a fotorezponzív rendszerek adott távolságon (1-10 nm) belüli integrációját.

Lehetséges elviekben a nagyobb távolságokra (a hullámhossztól függően, 10-1000 nm) is alkalmazható, fotonemisszió és reabszorpció alapuló radiatív energiatranszfer, az ún. nanolámpás megközelítés is amennyiben elég nagy a kromofor koncentráció (ld. belső szűrő hatás) és a közeg optikai tulajdonságai is megengedőek. Azonban egy biolumineszcens rendszer bevétele a klinikumban elképzelhetetlen, mivel a célsejtek előzetes genetikai módosítását implicálja. Továbbá, annak ellenére, hogy a biolumineszcens élőlények vagy a biolumineszcencia alapú assayk látványosak illetve érzékenyek, a jelenség nem igazán alkalmas pl. fotokémiai reakciók kiváltására az igen gyenge fotonfluxus miatt (1 foton/biokémiai reakció).

Az irodalomban találunk példát ilyen nanolámpás megközelítésekre, pl. félvezető nanorészecskék (Quantum dots, QD) - https://doi.org/10.1007/978-3-319-51192-4_2 - vagy felkonvertáló nanorészecskék (upconverting nanoparticles, UCNP) alkalmasak fotokémiai reakció kiváltására, ahogy ezt mi is bemutattuk a közelmúltban (<https://doi.org/10.3390/s24247987>), ám ezek ugyanúgy külső fényforrást alkalmaznak és legfeljebb a biológiai alkalmazás szempontjából kedvezőbb hullámhossz használatát teszik lehetővé (UCNP). E rendszerekben akkor lehet hatékonyan fotokémiai reakciót kiváltani, ha a nanorészecske, mint fényforrás lumineszcens kvantumhatásfoka és az energiadonor abszorbananciája kellően nagy.

A 3. téma 2 vegyülete mutatta a legjobb tulajdonságokat. Ennek kapcsán érdekes lehetne a (+)-töltésű rész még közvetlenebb kapcsolata a kumarin résszel. Megvalósítható lenne-e a kapcsolt piridínium rész kialakítása 1-vinilpiridínium sóként? Végeztek-e ennek tulajdonságaira számításokat?

Mi magunk nem végeztünk ilyen számításokat, viszont Lin és munkatársainak elméleti és kísérleti eredményei rávilágítottak arra, hogy a kumarinváz 3-as pozíciójában lévő elektronszívó szubsztituensek (pl. 1-metil piridínium-4-il, vagy az általunk előállított 1-metil 4-vinilpiridínium) stabilizálják az erre a kromofor családra jellemző TICT (twisted internal charge transfer) állapotot, melynek kialakulása mind a fluoreszcenciás, mind a fotokémiai kvantumhasznosítási tényező csökkenését eredményezi (<https://doi.org/10.1039/D4SC06578F>). Megállapították, hogy minél közelebb helyezkedik el az elektronszívó csoport a kumarinvázhoz, annál jobban érvényesül ez a hatás. E megfigyelésekre hivatkozva azt tudom elképzelni, hogy az elektronszívó csoport intímabb kapcsolódása a TICT állapot stabilizálásával a kvantumhatékonysági tényezők csökkenését eredményezi.

Bár ilyen motívumot tartalmazó kromoforral nem találkoztam a szakirodalomban, a szintézis megvalósítására javasolható reakciósor pl. az 1-(2-brómetil)piridíniumból kiinduló 1-vinilpiridínium só előállítása, majd ennek Heck-keresztkapcsolása a megfelelő 3-brómkumarinnal.

Budapest, 2025. április 4.


Kele Péter