

Bioortogonálisan modulált fotoreszponzív rendszerek alkalmazása a kémiai biológiában

KELE Péter^{a,*}

^aMTA – HUN-REN TTK Lendület Kémiai Biológia Kutatócsoport, HUN-REN TTK, Szerves Kémiai Intézet, Magyar tudósok krt. 2, 1117 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Mintegy 20 éves múltat tekint vissza a kémia- és a biológiai tudományok közé ékelődő interdiszciplináris tudományterület, a kémiai biológia.¹ A biokémiától eltérően, mely a biomolekulák kémiáját, szabályozását kutatja, ez a viszonylag fiatal határtudomány a kémia eszköztárát alkalmazza a biológiai rendszerek vizsgálatára, azok jobb megértése vagy működésükbe való beavatkozás céljából. A biológiai rendszereket felépítő molekulák kémiai módosítása élő sejtekben különösen nagy kihívás. Ez rávilágít a rendelkezésünkre álló olyan kémiai átalakítások jelentőségére, amelyek segítségével lehetővé válik a kiválasztott biomolekulák szelektív, akár helyspecifikus átalakítása is anélkül, hogy ez befolyásolná a sejtek vagy a magasabb szintű szervezetek életképességét. Ebből a szempontból különösen jelentősek azok a szervezetidegen funkciócsoportok között lejátszódó, hatékony biokompatibilis reakciók, melyek lehetővé teszik az élő szervezetek biomolekuláinak szelektív, helyspecifikus módosítását. Az e feltételeknek megfelelő kémiaiailag és biológiaiailag inert, nem zavaró, nem interferáló, nem-természetes kémiai funkciócsoportok közötti reakciók alkalmazása inspirálta Carolyn R. Bertozzit a *bioortogonális kémia* koncepciójának kidolgozására, amelyet később Nobel-díjjal ismertek el.²⁻⁴ A kémiai biológiai manipulációk egyik leggyakoribb módja adott biomolekulák különféle markerekkel történő módosítása. A fluoreszcens markereken alapuló szuperfelbontású mikroszkópiai módszerek robbanásszerű fejlődésének köszönhetően ma már néhány nanométeres térbeli felbontás érhető el élő rendszerekben; például a MINIFLUX technikával ~2–3 nm lokalizációs pontosságot is demonstráltak. Ez a részletesség már csak mintegy egy nagyságrenddel marad el a krio-elektron-mikroszkópiában megszokott szerkezeti felbontástól.^{5,6} A jelzővegyületek mellett megnőtt az olyan, fényel távolítható védőcsoportok jelentősége is, melyek alkalmasak pl. kemo-terápiás hatóanyagok aktivitását átmenetileg blokkolni.⁷⁻¹⁰ A HUN-REN TTK Kémiai Biológia Kutatócsoportjában azt tanulmányozzuk, hogyan lehet a bioortogonális kémia eszköztárának segítségével modulálni a fotoreszponzivitást.^{11,12} Érdeklődési körünk elsősorban olyan, bioortogonális funkciócsoporttal rendelkező fluoreszcens markerekre és fényérzékeny védőcsoportokra terjed ki, melyekre jellemző, hogy csak egy specifikus, bioortogonális kémiai

reakcióval történő módosítás során válnak fényre érzékenyű, azaz válnak fluoreszcenssé (markerek), vagy képessé arra, hogy fény hatására egy kötéshasadás eredményeként hatóanyagokat szabadítsanak fel.

2. Bioortogonálisan aktiválható fluorogén markerek

Az élő rendszerek optikai képalkotással történő vizsgálata elősegíti a sejtes folyamatok mélyebb megértését, mivel minimálisan vagy egyáltalán nem invazív jellege lehetővé teszi azok tanulmányozását akár élő szervezetekben is. Új genetikai és anyagcsereutak, illetve gyógyszerműködési mechanizmusok feltárásával az élősejtes képalkotási módszerek a gyógyszerkutatásban is jelentős szerepet kaphatnak. Az elmúlt évtizedek erőfeszítései jelentős hardverszintű fejlesztéseket eredményeztek a fluoreszcens mikroszkópiában, amelyek forradalmasították az optikai képalkotás területét.^{5,6} Az újonnan megjelent determinisztikus és sztochasztikus szuperfelbontású mikroszkópiás (SRM) módszerek lehetővé teszik a sejtszerkezetek natív környezetükben való vizualizálását, korábban soha nem látott részletességgel. A legújabb hardverfejlesztések teljes kiaknázása és az összetettebb kérdések megválaszolása érdekében azonban szükséges a szuperfelbontású mikroszkópiás módszerek növekvő igényeinek kielégítése a kémia oldaláról is. Ezek az igények határozták meg a fluoreszcens markerek területén az utóbbi évek kutatási irányait, hiszen a fluoreszcens képalkotás egyik legnagyobb korlátja ma leginkább a megfelelő jelzővegyületek hiányában rejlik. Még az olyan markerek esetében is, melyek ideális fotofizikai tulajdonságokkal rendelkeznek – mint például nagy moláris extinkciós együttható, fluoreszcencia-kvantumhatásfok vagy a fotostabilitás – a jel-zaj arányt gyakran rontja az endogén fluorofórok (pl. NADH, flavinok, porfirinek, aromás aminosavak stb.) által keltett fluoreszcencia.¹³ Az ilyen, ún. autofluoreszcencia okozta zavaró hatások kezelésére megoldást jelenthetnek a nagy Stokes-eltolódással rendelkező festékek, mivel a természetes fluorofórok gerjesztési és emissziós maximumai nagyon közel esnek egymáshoz. Ugyancsak hatékonyan csökkenthető az autofluoreszcencia olyan festékek alkalmazásával, amelyek gerjesztési sávja a vörös, távoli vörös vagy közeli infravörös tartományba esik. Az autofluoreszcencia csökkenése mellett ez azért is előnyös, mert a hosszabb hullámhosszú fényrel mélyebben elhelyezkedő biológiai

* E-mail: ke.le.peter@ttk.hu

struktúrák is tanulmányozhatók. Továbbá, a vörös tartományban kibocsátott fénynek nincs DNS-károsító hatása, így a citotoxicitás is jelentősen csökken. A megfelelő jel/zaj arány elérése szempontjából további kihívást jelent, hogy a szintetikus jelzővegyületek nem-specifikus adszorpciójuk miatt jelentős háttérfluoreszcenciát okozhatnak, ami ugyancsak az érzékenység és a felbontóképesség csökkenését eredményezi. Bár ez a probléma több mosási ciklussal méréselkelhető, ez azonban időigényes, így jelentősen késlelteti a mikroszkópos adatok feldolgozását, és megakadályozza a vizsgált biomolekulák azonnali detektálását közvetlenül a jelölési reakciók után. Ez különösen kritikus például rövid lebomlási idővel rendelkező fehérjék esetében. A probléma orvoslására kiválóan alkalmasak az ún. fluorogén jelzővegyületek.¹⁴⁻¹⁶ Az ilyen típusú markerekre az jellemző, hogy szabad állapotukban detektálás hullámhosszán nem, vagy csak alacsony intenzitással fluoreszkálnak, a specifikus ligációs reakciót követően viszont nagyságrendekkel megnő az emissziójuk intenzitása. A fluorogén vegyületek közül kiemelkedő fontosságúak az olyan bioortogonális funkció csoporttal rendelkező származékok, melyekben maga a bioortogonális funkció csoport felelős a fluoreszcencia kioltásáért. A specifikus, bioortogonális reakciót követően viszont ez az emissziót tompító hatás megszűnik és a fluoreszcencia intenzitása akár több nagyságrenddel is növekszik. A bioortogonális funkciócsoportok közül, megfelelő tervezés esetén hatékony tompító hatás érhető el az azid és a tetrazin motívummal.

2.1. Két bioortogonális egységgel modulált markerek

Kezdeti kísérleteink a vörös irányba tolt emissziójú fluorogén vegyületek pl. azidcsoporttal kapcsolt fluoreszcens vázak előállítására irányultak, amelyek nagy Stokes-eltolódással rendelkeztek. Az ezekkel a markerekkel végzett elméleti vizsgálatok egy új, rotációalapú kioltási mechanizmust tártak fel azokban az esetekben, amikor az azid közvetlenül kapcsolódott a fluoreszcens vázhoz.¹⁷ Megállapítottuk, hogy az azidcsoport rotációja következtében lehetővé válik a két legalacsonyabb gerjesztett állapot közötti belső konverzió, ami végül a gerjesztett állapot nem-radiatív relaxációjához vezet. Az azidcsoport bioortogonális reakcióban történő átalakítását követően már nem lehetséges a két gerjesztett állapot közötti belső konverzió, így a relaxáció a fény elnyelése következtében elsődlegesen kialakuló állapotból történik, fotonemisszióval. Ugyanakkor, ha ezt a kioltási mechanizmust kiterjesztett π -konjugációval, azaz vörös irányba eltoló gerjesztési maximummal rendelkező vegyületekre alkalmaztuk, a rotációalapú kioltás kevésbé bizonyult hatásosnak.¹⁸ Vizsgáltuk annak lehetőségét, hogy több kioltócsoport vajon eredményesebben oltja-e ki a fluoreszcenciát. Feltételeztük, hogy az ilyen, két azidcsoportot tartalmazó fluorogén vegyületek egy bifunkcionalizált célplatformmal történő klikk-reakcióban olyan ciklikus termékeket adnak, melyek korlátozott konformációs szabadságuknak köszönhetően további fluoreszcencia növekedést eredményeznek akár π -kiterjesztett vázelemek esetén is. Hipotézisünket egy

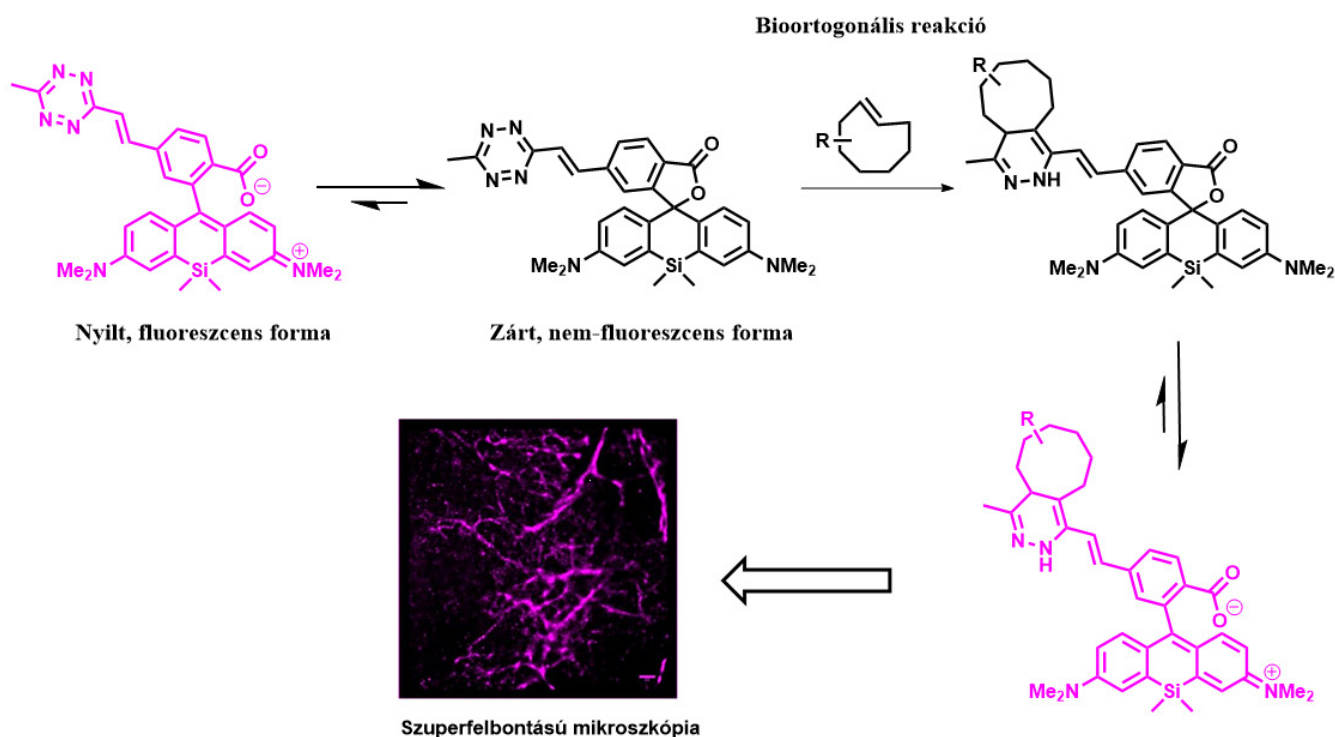
bisz-azido-benzotiazolil-kumarin vázelemen teszteltük, és tanulmányoztuk annak fluorogén viselkedését különböző bisz-cikloooktinilezett peptidszekvenciákkal szemben.¹⁹ Az elméleti számítások rávilágítottak a keletkező ciklikus konjugátumok méretének jelentőségére, mivel a végtermékek fluoreszcenciája nagymértékben függött a keletkező ciklikus termék konformációjától. Ezen eredmények hatására ugyanezt a stratégiát alkalmaztuk különböző zöld, valamint sárga tartományban gerjeszthető cianinokra is.²⁰ Más fluorogén cianinokhoz képest ezek a kettősen-kioltott rendszerek figyelemre méltó fluoreszcencia-intenzitás növekedést mutattak ciklikus festék-peptid konjugátumok képződésekor. Később az azid helyett a tetrazin bioortogonális funkció alkalmazására tértünk át, ami lényegesen gyorsabb jelölési reakciókat tett lehetővé.²¹ Az optimalizált bisz-cikloooktinilezett peptiddel való reakció során tízszeres fluoreszcencia-növekedést figyeltünk meg. Bár e vegyületek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeztek mind a fluorogenicitás, mind a spektrális maximumok tekintetében, gyakorlati alkalmazásuk számos biotechnológiai nehézségbe ütközik. Ezért alternatív megoldásokat kerestünk arra, hogy a vörös tartományban abszorbeáló, hatékony bioortogonálisan kontrollált fluorogenicitással rendelkező vegyületeket állítsunk elő. Felismertük, hogy a bioortogonális kioltó csoportokra épülő megközelítés korlátait úgy lehet áthidalni, hogy a kioltócsoportok számának növelése helyett a kioltási mechanizmusokat kombináljuk a bioortogonális kontrollal. Ez a megközelítés lehetőséget teremtett a célfehérjék rutinszerű alkalmazására, amelyek esetében csupán egyetlen bioortogonális aminosav beépítése szükséges.

2.2. Elektronikusan kontrollált fluorogenicitás

Első ilyen megközelítésként egy széles körben használt, membránpermeabilis, szuperfelbontású mikroszkópiára is alkalmas NIR festékvázat vizsgáltunk. A szilikorodamin (SiR) váz nagy fotostabilitása és fényessége mellett arról is ismert, hogy fluoreszcenciája a közeg polaritása által befolyásolt zárt és nyílt forma közötti egyensúlytól függ. Az ezen az egyensúlyon alapuló szerkezeti fluorogenicitást kívántuk tetrazin csoport beépítésével modulálni, így a bioortogonális reakcióban bekövetkező elektronikus változásokkal befolyásolni (1. ábra). Ennek érdekében különböző tetrazinnal módosított SiR származékokat állítottunk elő, majd vizsgáltuk fluorogén viselkedésüket. Örömmelre, 20–40-szeres fluoreszcencianövekedést figyeltünk meg, ami akkoriban ebben a hullámhossztartományban kivételesnek számított.²² Ugyancsak ezt a tetrazinok és feszült gyűrűs dienofilek közötti inverz elektronigényű Diels-Alder (iEDDA) reakció által kiváltott ciklizációs (spiro-laktonizációs) egyensúly-eltolódást használtuk fel egy önoxidálódó fluorogén vegyület tervezésekor. A fentiazinok ismertek arról, hogy fénybesugárzás hatására képesek $^1\text{O}_2$ -t generálni. Az így létrejövő reaktív oxigénszpecieszek oxidálják a fenotiazinokat, ami szulfoxid vagy szulfon termékekhez vezet, amelyek a kiinduló vegyülethez képest lényegesen eltérő spektroszkópiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A fentiazin motívum jelen van a rodafentiazinokban is, ame-

lyek szintén képesek a spirolakton (zárt) – ikerion (nyílt) egyensúly kialakítására. Elképzelésünk szerint az erősen elektronhiányos tetrazin beépítése elősegíti az egyensúly eltolását a zárt forma felé, és ezáltal jelentősen lecsökkenti a kromofor $^1\text{O}_2$ szenzitizáló képességét. Vizsgáltuk, hogy valóban megfigyelhető-e különbség a rodafentiazin tetrazin, és piridazin (klikk-termék) formája között és markáns különbséget figyeltünk meg (20% vs. >90%) azok szulfoxidokká alakulásában. Ezen túlmenően jelentős különbséget tapasztaltunk a tetrazin és az klikk-termék abszorpciós és emissziós tulajdonságaiban. Míg a tetrazin abszorpciós maximuma 610 nm-en volt alacsony intenzitású 740 nm-

es emissziós csúccsal, a klikk-termékből származó szulfoxid termék intenzív abszorpciót és emissziót mutatott 550 nm-en, illetve 600 nm-en. A tetrazin és az oxidált iEDDA formák átfedő abszorpciója lehetővé tette, hogy a konfokális mikroszkóp 552 nm-es beépített lézérével oxidáljuk a klikk-terméket, és ezt követően gerjesszük a szulfoxid intenzív fluoreszcenciáját. Ugyanakkor a nem reagált tetrazin származék nem járult hozzá jelentősen a fluoreszcenciához még annak kismértékű oxidációja után sem, így lehetővé vált a mosásmentes jelölési eljárás alkalmazása. Sőt, az in situ képződött fluoreszcens forma STED mikroszkópiában is használható volt.²³



1. Ábra. A bioortogonális reakció hatása rodaminszármazékok szerkezeti fluorogenicitására. A bioortogonális reakció következtében eltolódik a fluoreszcens (nyílt) és a nem-fluoreszcens (zárt) formák közötti egyensúly

2.3. Kettős fluorogenicitás

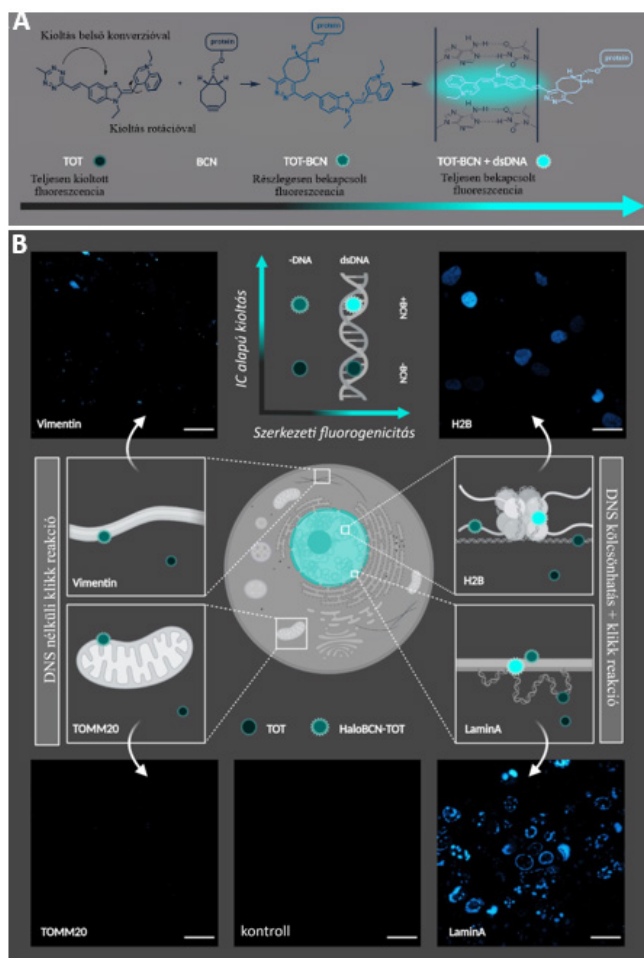
A fenti példákban a tetrazin klikk-reakciójának következtében bekövetkező elektronikus változásokat használtuk ki, hogy a fluorogenicitás a bioortogonális reakció kontrollja alatt álljon. Egy másik megközelítés során viszont olyan kettősen fluorogén jelzővegyületet terveztünk, amelyben két egymástól független kioltómechanizmussal terveztük elérni a nagyobb mértékű fluorogenicitást. Ebben az esetben a tetrazint egy tiazol-narancs DNS-interkalátor festékvázhoz kapcsoltuk. A jelzővegyület kettős fluorogén tulajdonságainak vizsgálata során bebizonyosodott, hogy a fluoreszcencia maximális intenzitása abban az esetben figyelhető meg, ha egyszerre teljesül a két, kioltásért felelős mechanizmus megszűnése, azaz a tetrazin bioortogonális reakcióban való átalakítása és a rotáció megszűnése DNS-sel való kölcsönhatás során. E kettős fluorogén jelleget élő

sejtekben is vizsgáltuk, melyek bioortogonalizált DNS-kötő fehérjéket expresszáltak. Az így módosított sejtek erős fluoreszcenciát mutattak, amely megfelelt a fehérjék lokalizációjának a kettős fluorogén markerrel való reakció követően. Ezzel szemben a hasonlóan bioortogonalizált citoszolikus fehérjék jelölése nem eredményezett fluoreszcencia-növekedést, mivel ott nem teljesült a DNS-sel történő kölcsönhatás feltétele (2. ábra).²⁴

2.4. Energiatranszferrel modulált fluorogenicitás

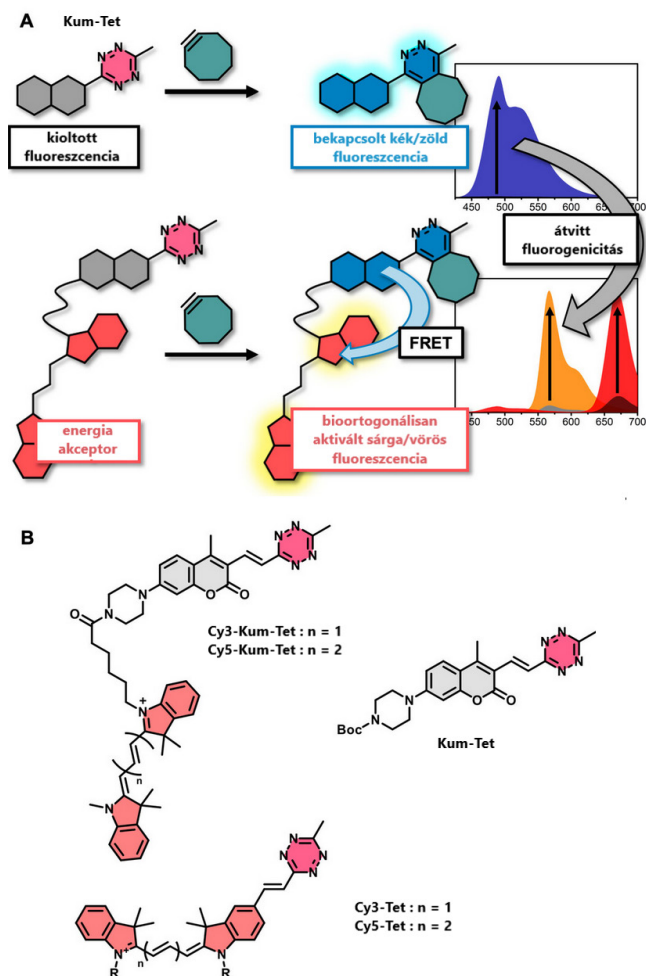
Behatóan tanulmányoztuk a tetrazin által kifejtett kioltási mechanizmust. Fenoxazin- és cianin vázelemeket kapcsolunk tetrazinhoz fenilén vagy vinilén linkerén keresztül.^{25,26} A spektrális tulajdonságok alapján arra következtettünk, hogy a fenilén-linkerén keresztüli kapcsolás esetén a rotáció korlátozottsága elektronikus lekapcsolást eredményez

a két egység között, ami a kötésen keresztüli energiaátvitellel (Through-bond energy transfer, TBET) teszi lehetővé a fluoreszcencia kioltását. Vinilén-linkeren keresztüli kapcsolás esetén azonban az abszorpciós és emissziós maximumok jelentős vörös eltolódása a tetrazin és a fluorofór konjugált kapcsolatát jelezte, ami más kioltási mechanizmust valószínűsített. Ráadásul ez a megoldás hatékonyabb kioltást eredményezett, mint a TBET. A tetrazin által kioltott Cy3 vázelemek alapos vizsgálata – direkt, illetve fenilén- vagy vinilén-linker alkalmazásakor – azt mutatta, hogy közvetlen vagy vinilén kapcsolt konjugáció esetén a tetrazin belső konverzióval oltja ki a fluoreszcenciát. Elméleti vizsgálatok szerint a fényel való gerjesztés során ilyenkor az S_2 (LUMO+1) állapot alakul ki, amely a vizsgált kromoforok $\pi-\pi^*$ átmenetének felel meg az oszcillátorerőségek alapján. A LUMO+1 \rightarrow HOMO átmenet nagy valószínűsége viszont ellentmond a kioltott fluoreszcenciának, ami gyors belső konverziót jelez egy sötét állapotba. Ezt a sötét állapotot azonosítottuk S_1 -ként (LUMO), amely a tetrazin $n-\pi^*$ (HOMO-1 \rightarrow LUMO) átmenetének felel meg.



2. Ábra. Kettősen fluorogén jelzővegyület. A) A tiazol-narancs fluoreszcenciáját a belső konverzió (tetrazin) és a vázon belüli szabad rotáció is kioltja. B) A kettősen fluorogén jelzővegyülettel kezelt bioortogonálisított citoszolikus fehérjéket (TOMM20 és vimentin) és magfehérjéket (H2B és LaminA) expresszáló sejtek konfokális mikroszkópos képe.

Eredetileg ezt a belső konverzió (IC) alapuló kioltást vinilén-linkerrel kapcsolt tetrazin–kumarin rendszereknél írtuk le, ahol rendkívül hatékony kioltást tapasztaltunk az S_2 és S_1 állapotok jelentős energiakülönbségének köszönhetően. Cianinok és egyéb, kiterjesztett p-rendszerrel rendelkező vázak esetében azonban az S_2 és S_1 állapotok energiái nagyon közel állnak egymáshoz, így reverzibilis átmenetek lehetségesek a két gerjesztett állapot között, ami kevésbé hatékony kioltást eredményez.²⁷ Ez egyrészt magyarázza, hogy miért fluorogénebbek a konjugált Cy3–tetrazinok, mint a TBET-alapú markerek, másrészt felfedi az IC-alapú kioltási mechanizmus hullámhossz korlátait is. Mivel elfogadtuk, hogy a tetrazinok kioltóképessége a kék–zöld tartományban emittáló vázak esetén a leghatékonyabb, egy koncepcionálisan eltérő fluorogén megoldást javasoltunk. E megoldási javaslat alapján tervezett jelzővegyületekben egy ultra-fluorogén vinil-tetrazinnal kapcsolt kumarint sárga (Cy3) vagy vörös (Cy5) tartományban emittáló vázakhoz kapcsoltunk. Feltételeztük, hogy ezekben a rendszerekben a tetrazin-kumarin bioortogonális kontroll alatt álló ultrafluorogén jellege Förster-típusú energiáttranszfer (FRET) révén átadódik a cianinnak, mint energia-akceptornak, így végső soron sárga/vörös fluorogenitást eredményezve (3. ábra). Ez az energiaátadáson alapuló kapcsolómechanizmus valóban jobb fluorogenitást adott (akár 16-szoros növekedést a Cy3 akceptor esetében), illetve megnövekedett fotostabilitást és nagy látszólagos Stokes-eltolódást eredményezett, ami alacsony háttérfluoreszcenciát tett lehetővé mosásmentes bioortogonális jelölési kísérletekben, élő sejtek intracelluláris struktúráin.²⁸ A tetrazin által kioltott cianin próbákkal összehasonlítva arra jutottunk, hogy a kromofor diádok sokkal kevesebb háttérjelet produkáltak. Emellett ezek a többkromofóros rendszerek jobb fotofizikai tulajdonságokkal rendelkeztek, mint az egyedi komponensek. A donor–akceptor közötti nem-radiatív energiaátadásból fakadó nagy látszólagos Stokes-eltolódás lehetővé tette a gerjesztési és emissziós sávok teljes szétválasztását, megszüntetve az önabszorpciót vagy a szóródásból eredő detektálási hibákat. Ezek az energiaátviteli diádok az alap tetrazin-kumarinnal együtt alkalmazva, háromszínű képalkotást tettek lehetővé intracelluláris célpontokon, egyetlen gerjesztési forrással és különálló emissziós ablakokkal, melynek köszönhetően csökkent gerjesztési kromatikus aberráció érhető el. A megnövekedett fotostabilitás lehetővé tette a hosszabb vagy intenzívebb besugárzást, amit a bioortogonálisan aktiválható FRET diádok segítségével szubdiffrakciós képalkotásban (STED mikroszkópia) ki is használtunk.

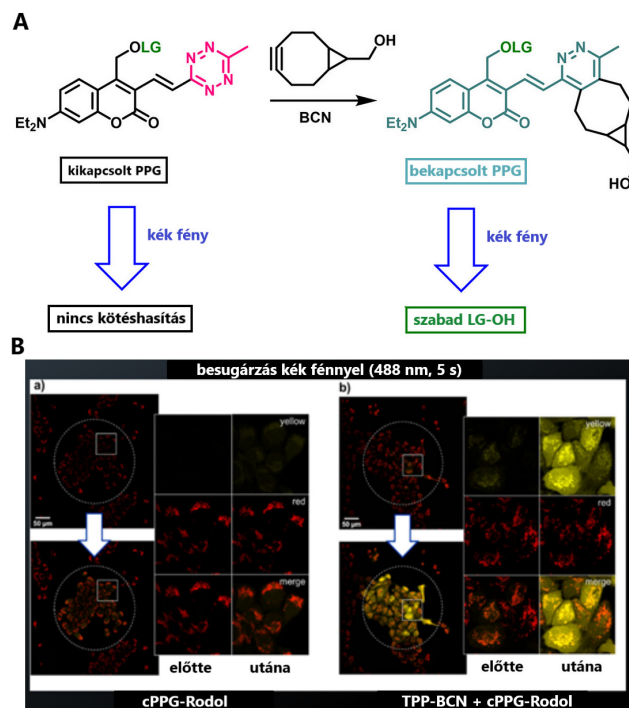


3. Ábra. Az energiaátvitellel átalakított fluorogenicitás. A) Az energia donor kiemelkedően fluorogén Kum-Tet és a vele FRET rendszert képező cianin jelzővegyületek spektrális változásai bioortogonális reakcióban. B) A vegyületek szerkezeti képletei.

3. Bioortogonálisan aktiválható fotolabilis védőcsoportok

Az elmúlt években egyre nagyobb a jelentősége az olyan kutatásoknak, melyek fényvel lehasítható vegyületek előállítását célozzák. Ezek a fotolabilis védőcsoportok (photolabile protecting group, PPG) lehetővé teszik pl. terápiás hatóanyagok fényvel történő felszabadítását, megnyitva ezzel az utat ún. fotoaktivált kemoterápiás eljárások felé, ahol a fény kiváló tér- és időbeli kontrollja mellett aktiválhatók a hatóanyagok.²⁹⁻³² Ezekre a fotoaktiválható kemoterapeutikumokra jellemző, hogy a védőcsoporttal való módosítás során a gyógyszervegyület ideiglenesen elveszíti biológiai hatását. A tumor környezetébe juttatva, majd megfelelő hullámhosszú fényvel 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, ha csak 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.



4. Ábra. Bioortogonálisan aktiválható, feltételes fotoaktiválhatóság. A) A viniltetrazin belső konverzióval hatékonyan szünteti meg a fényabszorpció hatására keletkező gerjesztett állapotot, így nem történik meg a fotolitikus hasítás. A bioortogonális reakciót követően a kioltó hatás megszűnik és kék fényre bekövetkezik a fotolízis. B) A feltételes fotoaktiválhatóság élő sejtekben, egy fluorogén festék fotolízisében bemutatva; bal: ciklootkin hiányában, jobb: ciklootkin jelenlétében.

3.1. Belső konverzióval modulált fotolabilis védőcsoportok

Elsőként a kumarin típusú fényérzékeny védőcsoportok gerjesztési hullámhosszát befolyásoló tapasztalatainkat, illetve a vinil tetrazin motívum segítségével megvalósítható, a gerjesztett állapot hatékony, belső konverzióval történő relaxációját eredményező hatását aknáztuk ki. Az előállított, vinil tetrazinnal modulált kumarin típusú fotolabilis védőcsoporttal végzett kísérleteink során igazoltuk, hogy a tetrazin hatékony kioltásának köszönhetően a megfelelő hullámhosszú fényvel való besugárzás során nem történik meg a fotodisszociációs lépés.³³ A tetrazin Diels-Alder reakcióját követően viszont, a kioltómechanizmus megszűnését és a fotoreszponzivitás visszanyerését követően kék-fénnyel (488 nm) besugározva a vegyületeket, megtörtént a modellvegyületek felszabadulása. Ezt a bioortogonális re-

akciótól függő feltételes fotoaktiválhatóságot (conditionally activatable PPG, cPPG) élő sejtekben is bizonyítottuk, egy fluorogén vegyület felszabadításával (4. ábra).

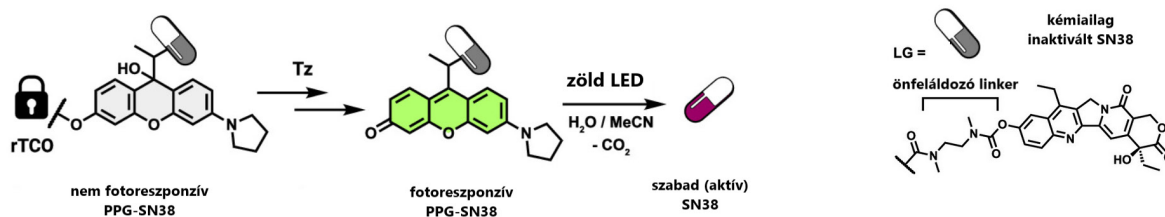
Ezek az eredmények olyan új kutatási irány alapjait fektették le, mely segítségével megvalósítható a feltételesen fotoaktiválható kemoterápia. A klinikai translációhoz azonban szükséges olyan kihívások megoldása, mint a feltételes fotoaktiválhatóság nagyobb hullámhosszú fényvel aktiválható védőcsoportokra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

3.2. Bioortogonális kötőhasítással modulált fotolabilis védőcsoportok

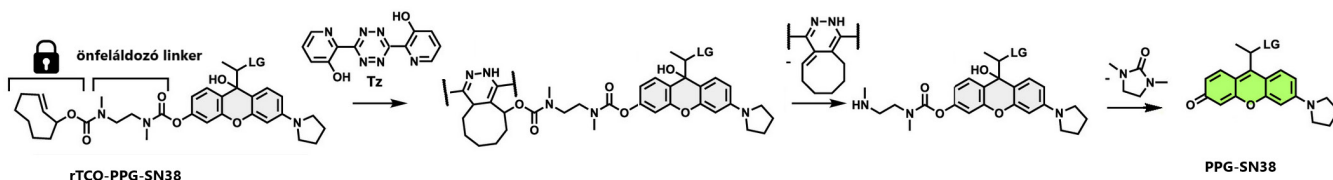
A fluorogén jelzővegyületek tervezése során szerzett tapasztalataink alapján tudjuk, hogy a belső konverzió alapuló kioltás csak az UV/kék tartományban gerjeszthető, kék/zöld tartományban emittáló vázak esetében eredményezi hatékonyan a gerjesztett állapot relaxációját. A biológiai alkalmazás szempontjából kívánatosabb zöld/vörös tartományban gerjeszthető kromofor vázak esetében ezért

alternatív megoldást kellett keresnünk. Olyan megoldást javasoltunk, ahol a bioortogonális motívum funkcióját újradefiniáltuk. Reméltük, hogy e módosított szerepkör képes áthidalni a tetrazin-alapú kioltás vörös/NIR-tartományban megfigyelhető korlátait. Bioortogonálisan generált kinon-metidekkel kapcsolatos kutatásainkra³⁴ építve vizsgáltuk, hogy a bioortogonális klikk reakciókon alapuló kötőhasítási reakciók (click-to-release, c2r)^{35,36} alkalmazhatók-e fenolos távozócsoportot képviselő fotolabilis védőcsoportok esetében. Ehhez, a kutatócsoportban nemrég kifejlesztett xanténium-típusú PPG-k³⁷ közül a fenolos auxokromot tartalmazó rodol-analógot (X540) választottuk. Megállapítottuk, hogy az X540 fotolabilis védőcsoport oxigénatomjának bioortogonális (c2r) reakcióban eltávolítható szubsztituenssel történő módosítása teljesen inaktívvá teszi a rendszert, azaz 540 nm-es besugárzás hatására nem következik be a kapcsolt hatóanyag felszabadulása, mivel a módosítás a kromofór vázát egy szintelen forma irányába tolja. A bioortogonális reakcióban eltávolítható szubsztituens lehasadását követően viszont visszakapjuk a fényre reagálni képes, fotoreszponzív színes (oxo) formát, melyet zöld fényvel besugározva a hatóanyag immár felszabadul (5. ábra).³⁸

A



B



5. Ábra. Bioortogonális kötőhasításon alapuló feltételes fotoaktiválhatóság. A) A rodol PPG fotoreszponzivitása kioltható egy bioortogonális reakcióban eltávolítható szubsztituenssel. B) Az aktivátor tetrazin (Tz) jelenlétében lejátszódó kötőhasítási kaszkád eredményeként a PPG újra fotoreszponzív lesz.

E szubsztitúciófüggő, bioortogonálisan szabályozott fotoaktiváláson alapuló koncepciót sejtes környezetben is megvalósítottuk, ahol mind a c2r reakciót elindító bioortogonális reagens, mind a fény jelenléte szükséges volt a hatóanyag, a topoizomeráz-inhibitor SN38 felszabadításához.

Jelenleg vizsgáljuk további tervezési stratégiák alkalmazhatóságát, hogy a feltételes fotoaktiválhatóság koncepcióját fenolos oxigént nem tartalmazó, vörös tartományban gerjeszthető fotolabilis védőcsoportokra is kiterjesszük. Ugyancsak vizsgáljuk fényre aktiválható bioortogonális funkciók csoportok kialakítási lehetőségeit, hogy így érjünk

el a hatóanyagok időben és térben precíz felszabadításához szükséges kettős, kémiai és fizikai kontrollt.

Köszönetnyilvánítás

Ez a munka a Magyar Innovációs és Technológiai Minisztérium által a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból (NKFIH-K-143581, NKFIH-ADVANCED-152281), továbbá a Magyar Tudományos Akadémia Lendület Programja (LP-2024-11) által nyújtott pénzügyi támogatás segítségével valósult meg.

Hivatkozások

- Bird, R. E.; Lemmel, S. A.; Yu, X.; Zhou Q. A. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 2457–2479.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00461>
- Prescher, J.; A. Bertozzi, C. R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.
<https://doi.org/10.1038/nchembio0605-13>
- Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2003**, *100*, 14846–14851.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2335201100>
- Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
<https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>
- Sigal, Y. M.; Zhou, R.; Zhuang, X. *Science* **2018**, *361*, 880–887.
<https://doi.org/10.1126/science.aau1044>
- Wang, L.; Frei, M. S.; Salim, A.; Johnsson, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 2770–2781.
<https://doi.org/10.1021/jacs.8b11134>
- Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G.; Heckel, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.
<https://doi.org/10.1002/anie.201202134>
- Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.
<https://doi.org/10.1021/cr300177k>
- Weinstain, R.; Slanina, T.; Kand, D.; Klán, P. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 13135–13272.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00663>
- Welleman, I. M.; Hoorens, M. W. H.; Feringa, B. L.; Boersma, H. H.; Szymański, W. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 11672–11691.
<https://doi.org/10.1039/D0SC04187D>
- Kozma, E.; Kele, P. *Top. Curr. Chem.* **2024**, *382*, 7.
<https://doi.org/10.1007/s41061-024-00452-1>
- Kozma, E.; Bojtár, M.; Kele, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202303198.
<https://doi.org/10.1002/anie.202303198>
- Monici, M. *Biotech. Annu. Rev.* **2005**, *11*, 227–256.
[https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2)
- Hori, Y.; Kikuchi, K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 644–650.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.05.015>
- Wang, L.; Tran, M.; D'Este, E.; Roberti, J.; Koch, B.; Xue, L.; Johnsson, K. *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 165–172.
<https://doi.org/10.1038/s41557-019-0371-1>
- Kozma, E.; Kele, P. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 215–233.
<https://doi.org/10.1039/C8OB02711K>
- Herner, A.; Nikić, I.; Kállay, M.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3297–3306.
<https://doi.org/10.1039/c3ob40296g>
- Herner, A.; Girona, G. E.; Nikić, I.; Kállay, M.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1370–1374.
<https://doi.org/10.1021/bc500235p>
- Demeter, O.; Fodor, E. A.; Kállay, M.; Mező, G.; Németh, K.; Szabó, P. T.; Kele, P. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 6382–6388.
<https://doi.org/10.1002/chem.201504939>
- Demeter, O.; Kormos, A.; Koehler, C.; Mező, G.; Németh, K.; Kozma, E.; Takács, L. B.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 1552–1559.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00178>
- Kormos, A.; Koehler, C.; Fodor, E. A.; Rutkai, Z. R.; Martin, M. E.; Mező, G.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 8841–8847.
<https://doi.org/10.1002/chem.201800910>
- Kozma, E.; Estrada Girona, G.; Paci, G.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6696–6699.
<https://doi.org/10.1039/C7CC02212C>
- A. Kormos, D. Kern, A. Egyed, B. Söveges, K. Németh, P. Kele, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 5425–5428.
<https://doi.org/10.1039/D0CC01512A>
- Kormos, A.; Egyed, A.; Olvany, J. M.; Szatmári, Á.; Biró, A.; Csorba, Zs.; Kele, P.; Németh, K. *Chemosensors* **2022**, *10*, 37.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors10010037>
- Knorr, G.; Kozma, E.; Herner, A.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 8972–8979.
<https://doi.org/10.1002/chem.201600590>
- Knorr, G.; Kozma, E.; Schaart, J. M.; Németh, K.; Török, Gy.; Kele, P. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 1312–1318.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00061>
- Albitz, E.; Németh, K.; Knorr, G.; Kele, P. *Org. Biomol. Chem.* **2023**, *21*, 7358–7366.
<https://doi.org/10.1039/D3OB01204B>
- Albitz, E.; Kern, D.; Kormos, A.; Bojtár, M.; Török, G.; Biró, A.; Szatmári, Á.; Németh, K.; Kele, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202111855.
<https://doi.org/10.1002/anie.202111855>
- Xiong, H.; Xu, Y.; Kim, B.; Rha, H.; Zhang, B.; Li, M.; Yang, G. F.; Kim, J. S. *Chem* **2023**, *9*, 29–64.
<https://doi.org/10.1016/j.chempr.2022.11.007>
- Bonnet, S. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 10330–10343.
<https://doi.org/10.1039/C8DT01585F>
- Yu, H.; Li, J.; Wu, D.; Qiu, Z.; Zhang, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 464–473.
<https://doi.org/10.1039/B901255A>
- Bretin, L.; Husiev, Y.; Ramu, V.; Zhang, L.; Hakkennes, M.; Abyar, S.; Johns, A. C.; Le Dévédec, S. E.; Betancourt, T.; Kornienko, A.; Bonnet, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202316425.
<https://doi.org/10.1002/anie.202316425>
- Bojtár, M.; Németh, K.; Domahidy, F.; Knorr, G.; Verkman, A.; Kállay, M.; Kele, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15164–15171.
<https://doi.org/10.1021/jacs.0c07508>
- Kern, D.; Lövei, A.; Kele, P.; Kormos, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2024**, e202400541.
<https://doi.org/10.1002/ejoc.202400541>
- Rossin, R.; Versteegen, R. M.; Wu, J.; Khasanov, A.; Wessels, H. J.; Steenbergen, E. J.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; van Onzen, A. H. A. M.; Hudson, P. J.; Robillard, M. S. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1484.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03880-y>
- De Roode, K. E.; Rossin, R.; Robillard, M. S. *Top. Curr. Chem.* **2025**, *383*, 12.
<https://doi.org/10.1007/s41061-025-00495-y>
- Egyed, A.; Németh, K.; Molnár, T. Á.; Kállay, M.; Kele, P.; Bojtár, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 4026–4034.
<https://doi.org/10.1021/jacs.2c11499>
- Ember, O.; Németh, K.; Kern, D.; Kormos, A.; Kele, P.; Bojtár, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2025**, *147*, 42, 38889–38896.
<https://doi.org/10.1021/jacs.5c15005>

Bioorthogonally modulated photoresponsive systems for chemical biology applications

Over the past two decades, chemical biology has emerged as an interdisciplinary field situated at the interface of chemistry and life sciences.¹ In contrast to biochemistry, which focuses on the chemistry and regulation of biomolecules, this relatively young discipline employs chemical tools to investigate biological systems. Studying the molecules that constitute living systems directly in their native cellular environment presents a considerable challenge, underscoring the importance of chemical biology, as its toolkit enables the selective, even site-specific modification of chosen biomolecules. In this context, highly selective and efficient biocompatible reactions between chemically and biologically inert, non-perturbing non-native functional groups better known as bioorthogonal reactions are of central importance, as they allow the selective, site-specific modification of biomolecules within living organisms.²⁻⁴ The visualization of biomolecules in their native context, as well as the imaging-assisted elucidation of complex biological processes, represents a major focus in chemical biology.^{5,6} Achieving this requires highly selective, often site-specific labeling strategies. Such challenges are effectively addressed by bioorthogonal chemistry, particularly when combined with modern synthetic biology approaches. Today, combination of bioorthogonal reaction pairs enables the selective incorporation of multiple labels into defined molecular targets, facilitating multi-color and/or multimodal imaging. In parallel, the development of probes tailored to the stringent requirements of super-resolution microscopy has significantly expanded the range of biological questions that can be addressed. These next-generation probes support highly sensitive, low-background (i.e., offering diminished auto- and background fluorescence), single- and multiphoton imaging of biomolecules and dynamic events in living systems at spatial resolutions approaching the size of the molecular targets themselves.

Fluorogenic probes that become emissive upon undergoing a bioorthogonal reaction have received significant attention in recent years as they offer much better signal-to-noise ratio due to significantly reduced background fluorescence.¹⁴⁻¹⁶ A central trend in bioorthogonal reaction-assisted labeling has therefore been the development of probes whose fluorescence is directly controlled by the bioorthogonal functional group itself. Among the various bioorthogonal functional groups capable of imparting fluorogenic behavior, tetrazines have proven particularly influential due to their well-documented quenching properties. Numerous studies have demonstrated the utility of tetrazine-mediated quenching, however, these also reveal a key limitation: the efficiency of tetrazine-based quenching decreases sharply as fluorophore emission shifts toward the biologically preferred red region of the spectrum. This drawback has motivated the search for strategies to enhance the fluorogenicity of tetrazine-modulated red-excitable probes.

Early efforts by our research group included the installation of two tetrazine units onto fluorophores.²¹ Although conjugation of these probes to doubly cyclooctynylated peptide tags fused to target proteins afforded improved fluorogenic response, likely due to the formation of conformationally constrained cyclic structures upon the bioorthogonal ligation step, the synthetic and biological complexity of the dual-tagging strategy limited its broader application. Subsequent approaches combined tetrazine-based bioorthogonal reactivity with structural-change induced fluorogenic mechanisms, yielding more substantial improvements. For example, a vinyltetrazine-appended 2'-carboxy silicorhodamine exploited a polarity-sensitive equilibrium between a fluorescent zwitterionic and a non-emissive spirocyclic form. Here, the electronic change accompanying the inverse electron-demand Diels-Alder (iEDDA) reaction of the tetrazine shifted the equilibrium to the emissive state, resulting in significantly enhanced

fluorescence turn-on (over 20-fold) (Figure 1).²² A related concept was applied to rhodaphenothiazines, where tetrazine ligation increased the chromophore's ability to sensitize singlet oxygen, ultimately triggering self-oxidation to yield an intensely fluorescent product (over 200-fold turn-on).²³

Environmentally responsive fluorogenic behavior is also well known in DNA intercalator frames such as thiazole orange, which is non-fluorescent in aqueous media due to rapid rotation about its central methine bridge. We introduced a tetrazine-modified thiazole orange probe (TOT) that combines rotational quenching with tetrazine-based quenching, creating a double fluorogenic system. In this design, both DNA intercalation and the bioorthogonal iEDDA ligation are required to achieve full fluorescence activation yielding over 200-fold increase. Using HaloTag fused proteins labeled with cyclooctyne-functionalized substrates (Halo-BCN), we demonstrated that TOT selectively lights up only when anchored to DNA-binding proteins in the nucleus, whereas labeling cytosolic proteins alone does not elicit fluorescence (Figure 2).²⁴

More recently, efforts to improve fluorogenicity in the red spectral region have led to the relayed fluorogenicity strategy. In this approach, the excellent fluorogenic characteristics of blue-excitable coumarins are transferred to orange/red-emitting cyanine dyes through Förster resonance energy transfer (FRET), resulting in substantially enhanced fluorogenic turn-on and improved signal-to-noise ratios in live-cell imaging (Figure 3).²⁷

In addition to fluorescent probes, the significance of light-cleavable protecting groups has also grown considerably, particularly in the context of transient inactivation and on-demand, light controlled activation of chemotherapeutic agents.²⁹⁻³² These photolabile groups enable the controlled release of therapeutic agents by light, paving the way for photoactivated chemotherapy, in which drug activation can be regulated with high spatial and temporal precision. Upon conjugation with a protecting group, the active drug is temporarily rendered inactive. Following accumulation in the tumor environment and irradiation with appropriately tuned light, the protecting group is cleaved and therapeutic activity is restored. This approach is highly effective for well-localized tumors. However, for dispersed or difficult-to-localize tumors, spatial control by light alone is insufficient, unless only conjugates that specifically associate with target cells respond to illumination. To address this challenge, we explored whether the design principles of bioorthogonally activatable fluorogenic probes could be extended to photosensitive protecting groups, enabling bioorthogonally activatable photolabile systems. Assuming that fluorescence and photodissociation originate from the same excited state, we drew upon our earlier work on tuning the excitation wavelengths of coumarin-based photolabile groups and on the efficient excited-state relaxation induced by vinyl-tetrazine moieties. In coumarin-based photolabile groups modulated by vinyl tetrazine, we demonstrated that tetrazine quenching suppresses photodissociation at the irradiation wavelength. After the tetrazine undergoes a Diels-Alder reaction, quenching is relieved, thus photoresponsivity is restored and illumination with blue light, effectively releases the payload. We confirmed this bioorthogonal reaction conditioned photoactivation concept in living cells by demonstrating light-triggered release of a fluorogenic molecule (Figure 4).³³

Very recently we leveraged bioorthogonal cleavage reactions to modulate the photoresponsivity of a rhodol-type of photolabile protecting group. We demonstrated that both the bioorthogonal reaction and green light irradiation is necessary to release and activate a topoisomerase inhibitor drug, SN38 (Figure 5).³⁸