

Kétpontos kötődésre alkalmas bioortogonális jelzővegyületek előállítása és alkalmazása

A doktori értekezés tézisei

Demeter Orsolya

okleveles vegyész

Témavezető: Dr. Kele Péter

Kémia Doktori Iskola

Iskolavezető: Dr. Császár Attila

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program

Programvezető: Dr. Perczel András



Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Budapest, 2017

Bevezetés

A kémia és a biológia határvonalán kialakult *kémiai biológia*¹ az utóbbi évtizedek jelentős új tudományterületeinek egyike, melynek módszerei egyaránt támaszkodnak a klasszikus szintetikus kémiára és a biotechnológia, bioinformatika legújabb eredményeire.

A kémiai biológia egyik alappillére a fluoreszcencia detektálásán alapuló analitika, ennek kombinációja a kémiai biológia egy másik jelentős újításával, az ún. bioortogonális ligációval minden korábbinál közelebbi betekintést enged a biológiai folyamatokba.² A bioortogonális reakción keresztül kivitelezett fluoreszcens jelölés több szempontból is előnyös. A vizsgálandó rendszerbe épített ún. kémiai hírvivő kis mérete és szerkezeti idegen jellege okán szelektív, fiziológiai körülmények között lejátszódó, nem toxikus reakciót biztosít, míg a komplementer funkcióval ellátott fluoreszcens festék hatékony, jó idő-, és térbeli felbontással rendelkező detektálásra ad lehetőséget. Figyelembe véve a legelterjedtebb festék-alapvázakhoz tartozó tetemes mennyiségű szintetikus és alkalmazásközpontú irodalmat, belátható, hogy a fluorofórok kémiájában az ésszerű irány nem az új fluoreszcens szerkezetek előállítása felé, hanem a már rendelkezésre álló szerkezetek finomhangolása, a gyakorlati alkalmazhatóság kiterjesztése felé mutat- például a detektálás korlátainak kibővítésével.³ A fluoreszcencia detektálásának egyik ilyen korlátja az elreagálatlan, nem specifikusan reagált vagy mosással el nem távolítható jelzővegyület jelenlétéből adódó háttérfluoreszcencia. Erre jelenthet megoldást, ha az alkalmazott festék fluorogén, azaz alapállapotban nem, vagy csak minimális emisszióval rendelkezik, a megfelelő jelölési reakció lejátszódása után azonban az emisszió tompításáért felelős csoport eltűnik és a keletkező konjugátum fluoreszcens lesz. A fluorogenicitáshoz hasonló, gyakorlati szempontból előnyös fotofizikai tulajdonságok mellett fontos az is, hogy a jelölő festék nagy szelektivitással kötődjön a jelölni kívánt biopolimerhez. Ilyen nagyfokú szelektivitás elérésére alkalmasak például a kétpontos kötődésre képes biszazén-típusú fluorogén festékek⁴⁻⁵ (FlAsH, ReAsH, AsCy3). Ezek a festékek az önjelölő peptidszakaszokon (self-labeling tags) belül megfelelő távolságra elhelyezkedő tetracisztein-motívumokhoz kapcsolódnak nagy szelektivitással. A vegyület csupán akkor válik fluoreszcenssé, ha a reakció megtörtént, azaz a biszazén-jelzővegyületek egyben fluorogének is.

A biszazén-festékek számos előny (membránpermeabilitás, széleskörű alkalmazhatóság) mellett hátrányoktól sem mentesek: számolni kell a mellékreakciók miatt fellépő háttérfluoreszcenciával valamint redukálószeres szükségességével is.

Célkitűzések

Doktori munkám során olyan jelzővegyület-kémiai hírvivő rendszerek felépítésével dolgoztam, amelyek ötvözik a bioortogonális kémia előnyeit a biszarzén-jelzővegyületek szelektivitásával.

A tervezett jelzővegyületek szerkezetével kapcsolatban az volt az alap gondolat, hogy egy eredendően fluoreszcens vázat két azid csoporttal módosítunk. A kísérletekbe szintetikus szempontból változatos vázrendszerek bevonását terveztük, melyeken a két azid csoport jelenléte több célt szolgál:

- mivel a már egyetlen azid csoportot tartalmazó festékek is hatékony fluorogének, előzetes terveink alapján két azid csoport beépítése még hangsúlyozottabb fluorogén jelleget, sőt, akár teljes fluoreszcencia-kioltást eredményezhet;
- a jelzővegyület részt vehet két, egymást követő gyűrűfeszültség által hajtott azid-alkin cikloaddícióban (SPAAC) olyan „önjelölő” peptidszakaszokkal, amelyekbe egymástól adott távolságra két ciklooktin-egységet építünk be;
- a jelölés nagy szelektivitását az biztosíthatja, hogy ha a két azid csoport közül csupán az egyik lép reakcióba, a másik továbbra is letöri az alapváz fluoreszcenciáját. Következtetésül, maximális fluoreszcencia csak akkor lesz detektálható, ha mindkét azid reakcióba lépett, azaz megtörtént a kétpontos kötődés.

A kutatási terv tehát magában foglalja a:

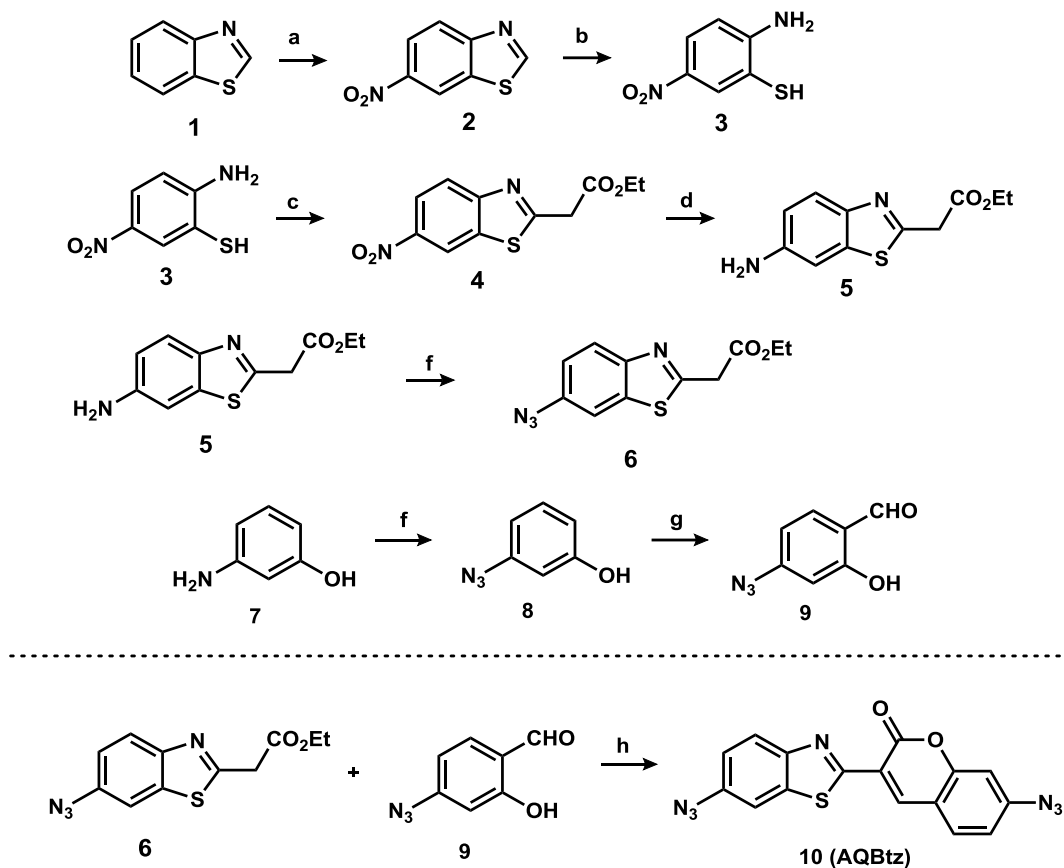
1. biszazid-típusú jelzővegyületek szintézisét, több alapvázra kiterjesztve, és az előállított jelzővegyületek fotofizikai paramétereinek vizsgálatát;
2. a bioortogonális kétpontos kötődés alapkoncepciójának vizsgálatát/bizonyítását és az alkalmazhatóság tanulmányozását biológiai modellrendszerekben, kutatócsoportok közötti együttműködés keretein belül.

Saját eredmények

A kutatás során elért eredmények a következő pontokban foglalhatóak össze:

1. Az AQBtz szintézise

Az alapfeltevésünk bizonyítására sikeresen előállítottunk egy olyan benziazolil-kumarin alapvázú festéket, amely két azid csoportot tartalmaz. A szintézist az 1. ábra részletezi.



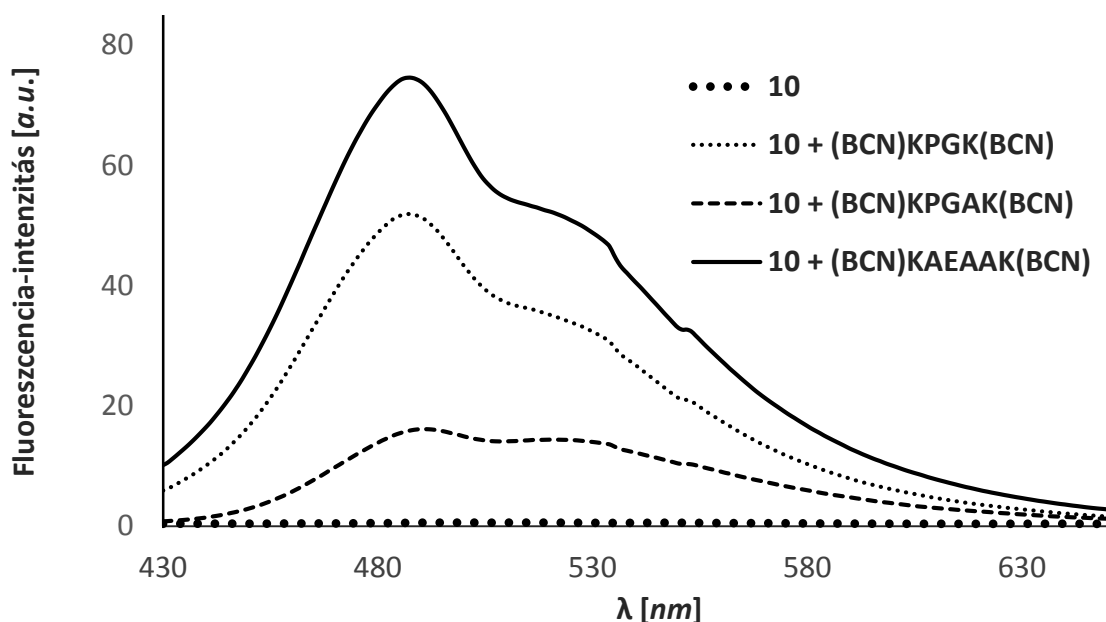
1.ábra. Az AQBtz szintézise. (a) $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, 60 %; (b) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MeOH, rt, 12 h, 96 %; (c) etil-cianoacetát, $130\text{ }^\circ\text{C}$, N_2 , 24 h, 41 %; (d) $\text{Fe}/\text{NH}_4\text{Cl}$, EtOH/ H_2O , $60\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h, 66 %; (e) 1. $t\text{-BuONO}$, MeCN, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min; 2. TMS- N_3 , N_2 , rt, sötét, ~77%; (f) 1. NaNO_2 , HCl, $0\text{-}5\text{ }^\circ\text{C}$; 2. NaN_3 , H_2O , 24 h, rt, sötét, 87 %; (g) $(\text{CH}_2\text{O})_n$, Et_3N , MgCl_2 , MeCN, Ar, $70\text{ }^\circ\text{C}$, 12 h, sötét, 50-80 %; (h) piperidin, EtOH, $55\text{ }^\circ\text{C}$, sötét, 60 %

2. Az AQBtz fluorogén jellege és kétpontos kötődése bisz-ciklooktinilezett modellpeptidekhez

Az AQBtz fotofizikai paramétereinek tanulmányozása során megállapítottuk, hogy alapállapotban nem rendelkezik emisszióval, tehát az a feltevésünk, miszerint két azid csoport jelenléte akár teljes fluoerescencia-letöréshez vezethet, helytállónak bizonyult.

A fluorogén jelleg vizsgálatára komplementer ciklooktinként a biciklo[6.1.0]non-4-in-9-il metanolt (**BCN**) alkalmaztuk. Két ekvivalens BCN-n vittünk reakcióba az AQBtz-vel és a keletkező termék fluoerescenciáját azonos gerjesztési hullámhosszon vizsgálva 140-szeres intenzitásbeli különbséget mértünk ahhoz a kontrollmintához viszonyítva, ami három órán keresztül BCN nélkül kevert AQBtz-t tartalmazott.

A kétpontos kötődés vizsgálatához azonosítottunk és együttműködés keretei között (*Dr. Mező Gábor*) előállítottunk három bisz-ciklooktinilezett modellpeptidet. Ezek reakcióját követve az előállított festékekkel azt tapasztaltuk, hogy ciklikus, fluoreszcens konjugátumok keletkeznek (2. ábra), a fluoreszcencia-serkentés az adott peptid szekvenciájának függvényében 130, 27 vagy 89 volt.



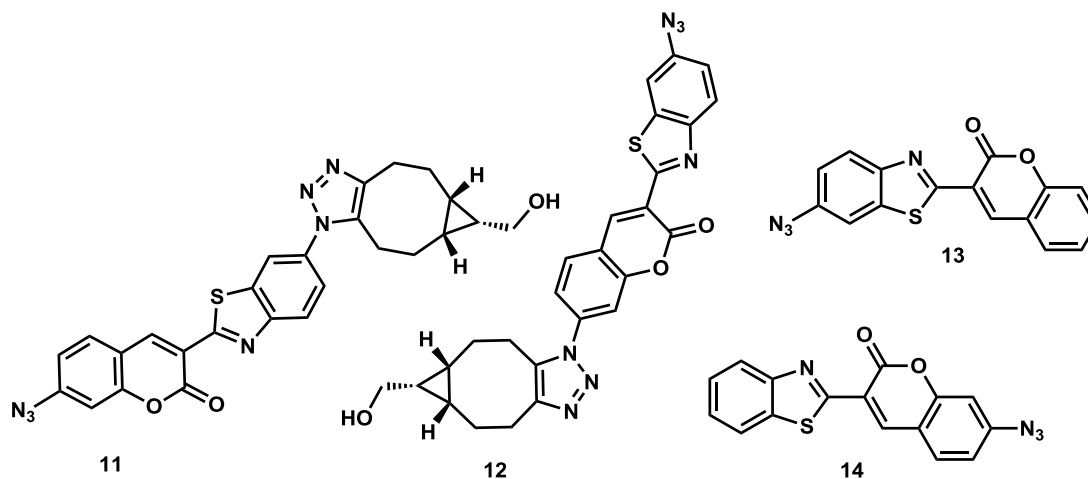
2. ábra. a 10-es számú festék fluoreszcenciájának összehasonlító vizsgálata a három modellpeptiddel való reakció során. A legintenzívebb emissziót a KAEEAAK szekvenciájú modellpeptid konjugátuma adta.

Ezekkel a jelentősen eltérő serkentési értékekkel kapcsolatban azt feltételeztük, hogy a ciklikus konjugátumok kialakulásakor egy alapvetően feszült szerkezet keletkezik, amelyben, a peptid szekvenciájától függően, a festéket alkotó két aromás mag síkja elfordulhat egymáshoz képest. A fluoreszcencia szempontjából a legelőnyösebb a planáris szerkezet, minden torzulás ehhez képest veszteséget okoz az emisszióban. Ez a torzulás számszerűsíthető, ha a kialakult konjugátumokban a két aromás sík által bezárt diéderes szögek kerülnek összehasonlításra, ezek meghatározása elméleti számításokon keresztül történt (*Dr. Kállay Mihály*). A számított diéderes szögek jó egyezést mutattak a mért adatokkal (1. táblázat).

Festék-peptid konjugátum	Fluoreszcencia-növekmény	diéderes szög (°)
10-BCN ₂	140	2
10-(BCN)KPGK(BCN)	89	7 / 83
10-(BCN)KPGAK(BCN)	27	58 / 73
10-(BCN)KAEEAAK(BCN)	130	3 / 83

1. táblázat. A kialakult konjugátumokhoz tartozó fluoreszcencia-növekmény és a számolt diéderes szögek

Annak igazolására, hogy a kétpontos kötődés biztosította nagy szelektivitás a fluoreszcencia-intenzitások értékeiben is tükröződik, arra volt szükség, hogy összehasonlítsuk egy egyszeresen kötődött (tehát egy szabad azidot még tartalmazó) és egy kétponton kötődött festék emisszióját. Ennek érdekében előállítottuk a **11** és **12** monoazid-monotriazol származékokat, valamint a **13** és **14** monoazid festékeket (*Fodor Anna Eszter, TDK dolgozat*) és azt tapasztaltuk, hogy ezek alapállapotban is számottevő emisszióval rendelkeznek, fluorogenicitásuk pedig messze elmarad az AQBtz-hez képest.

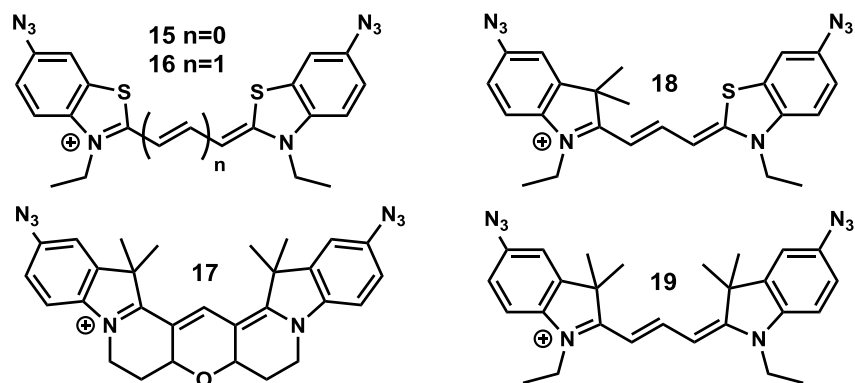


3.ábra. az előállított monoazid-monotriazol és monoazid festékek

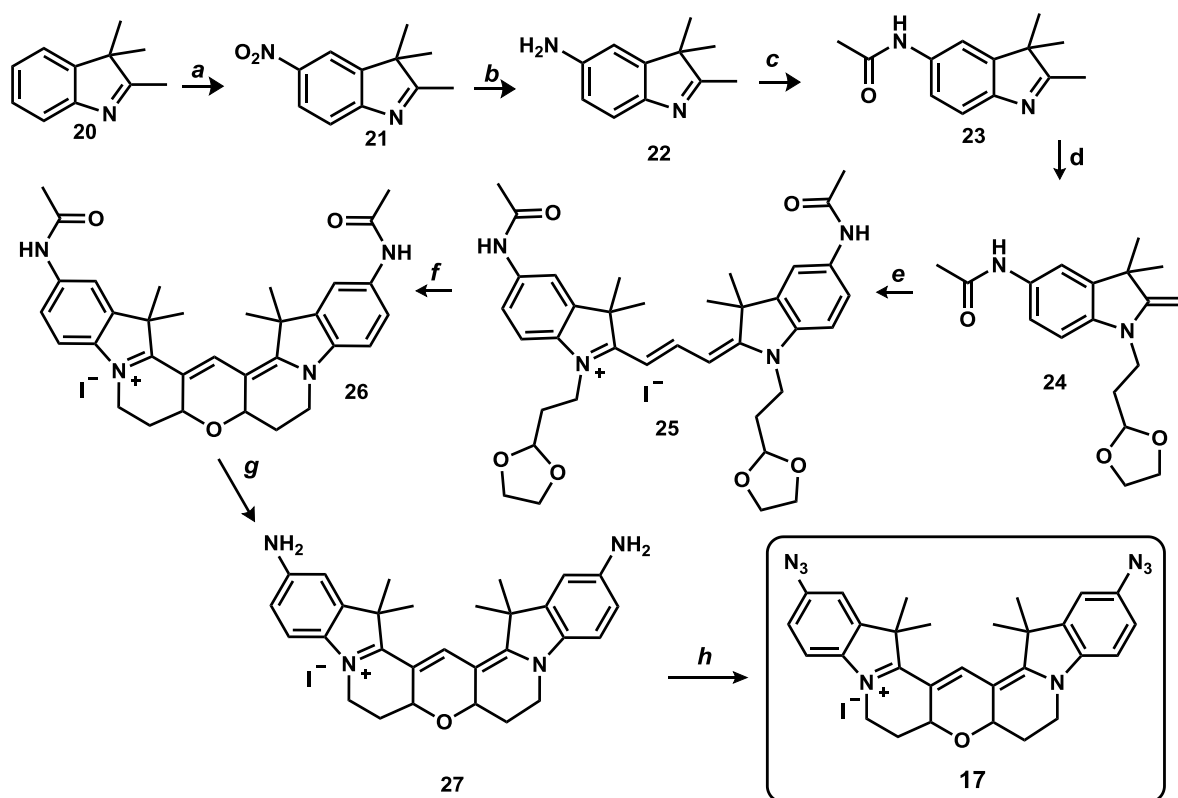
Ezekből az eredményekből az a következtetés vonható le, hogy a teljes fluoreszcencia-kioltáshoz a két azid csoport egyidejű jelenlétére van szükség és azok hatása a kétpontos kötődés során csak együttesen és multiplikatívan érvényesül.

3. Cianin-biszazidok: szintézisek

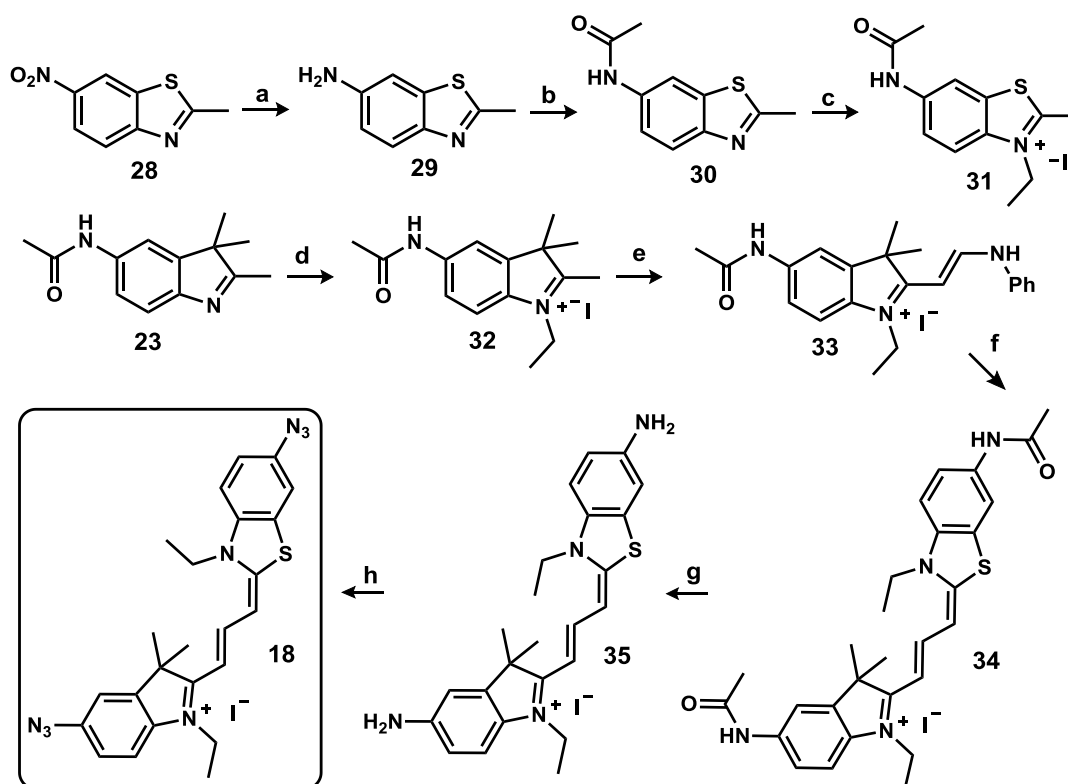
A kutatás második szakaszában az volt AQBtz-vel tesztelt és bizonyított alap gondolatot terjesztettük ki a cianinok spektrális szempontból előnyösebb⁶ családjára. Ennek érdekében öt cianin-biszazid festéket állítottunk elő (**15-19**), ezek közül a **15** és **16** előállítását *Kormos Attila* munkája volt.



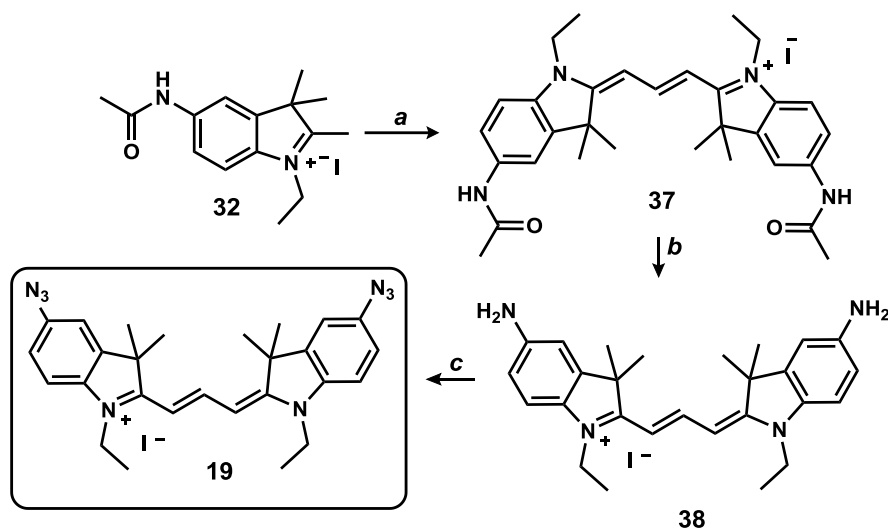
4. ábra. Az előállított cianin-biszazidok



4.ábra. A 17-es festék szintézise (a) KNO_3 , H_2SO_4 , 1h, 0°C , 92 % (b) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ccHCl , 1.5 h, Δ , 88 % (c) Ac_2O , MeCN , rt, 10 min, 92 % (d) 2-(2-jódetil)-1,3-dioxolán, MeCN , 100°C , 48 h, N_2 , 33-80 %; (e) $(\text{EtO})_3\text{CH}$, EtOH , Δ , 24 h, N_2 , 54 % (f) $\text{DCM}/\text{H}_2\text{SO}_4$, rt, 30 min, 75-80 %; (g) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, MeOH , 50°C , 2 h, N_2 , 60 %; (h) NaNO_2 , HCl , 0°C , 30 min, majd NaN_3 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$, 1h, 55 %.



5.ábra. A **18**-as festék szintézise. **4** (a) SnCl_2 , HCl , 1.5 h, Δ , 80 % (b) Ac_2O , MeCN , rt, 10 min, 96 % (c) EtI , 120°C , 12 h, 59 % (d) EtI , MeCN , Δ , 24 h, 84 % (e) *N,N*-difenil-formamidin, $(\text{EtO})_3\text{CH}$, EtOH , Δ , 24 h, 82 % (f) **31**, Ac_2O , piridin, Δ , 2 h, 67 %. (g) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, MeOH , 50°C , 12 h, N_2 , 78 %; (h) NaNO_2 , HCl , 0°C , 30 min, majd NaN_3 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$, 1h, 56 %.



6.ábra. A **19**-es festék szintézise. (a) $\text{HC}(\text{OEt})_3$, piridin, 12 h, Δ , 62 % (b) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, MeOH , 50°C , 12 h, N_2 , 86 % (c) NaNO_2 , HCl , 0°C , 30 min, majd NaN_3 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$, 1h, 64 %.

4. A 15-19 cianin-biszazidok fluorogén jellege és kétpontos kötődése bisz-ciklooktinilezett modellpeptidekhez

Vizsgáltuk az előállított cianinok fotofizikai paramétereit és fluorogenicitását. Megállapítottuk, hogy a cianinok kiterjedt konjugált rendszerének fluoreszcenciáját kevésbé képes tompítani a két azid csoport, az előállított származékok gyenge, de jól mérhető emisszióval rendelkeztek. A származékok fluorogenicitásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy két ekvivalens ciklooktinnel reagálva a származékok fluoreszcencia-serkentése 7-29 között volt.

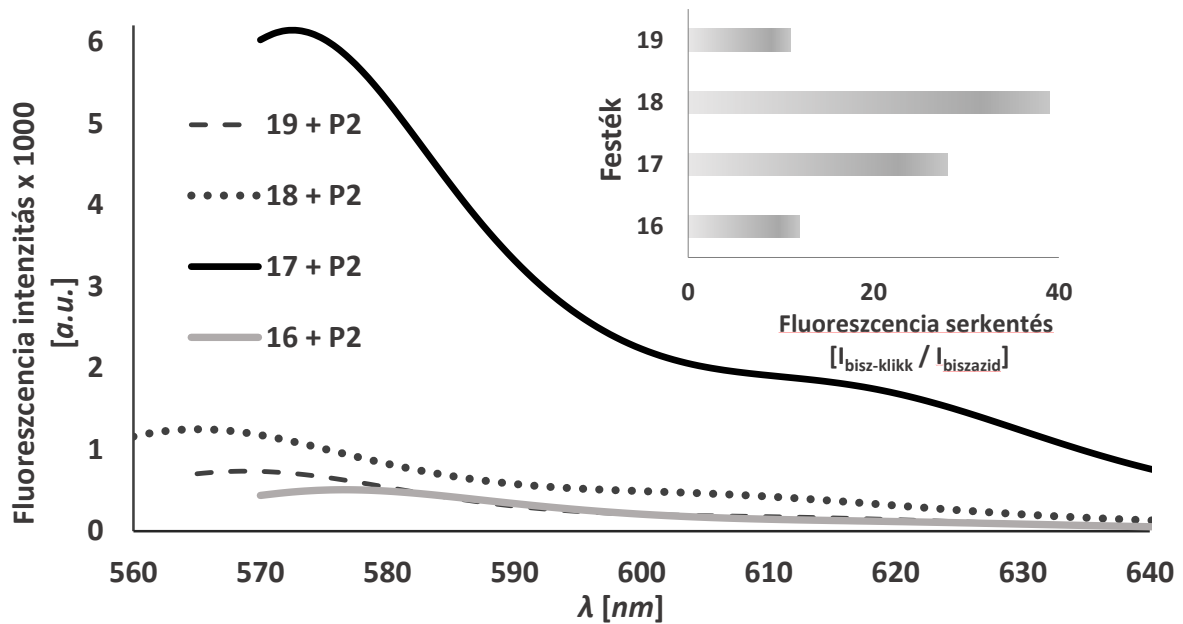
Festék	^a I _{BCN} / I _{biszazid}	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	^b $\Phi_{biszazid}$	^b Φ_{BCN}
15	14	410	487	0,00065	0,0073
16	7	560	575	0,0195	0,057
17	29	560	571	0,065	0,73
18	22	550	565	0,011	0,13
19	10	555	569	0,0125	0,082

2. táblázat. A 15-19 festékek fotofizikai paramétereit, fluoreszcencia-serkentési értékeik BCN-nel való reakciójuk után, illetve a kialakult és a kiinduló vegyületek kvantumhasznosítási tényezői. ^aPBS, c = 0,625 μ M, rt, két órányi reakcióidő után. ^bKvantumhasznosítási tényezők a Kumarin 153 (**15**) vagy a Rodamin B (**16-19**) festékekhez viszonyítva

A kétpontos kötődés vizsgálata során egy tizenegy tagú, Ac-K(BCN)AEAADAEAAK(BCN)-NH₂ szekvenciájú peptid (továbbiakban: **P2**) egy ekvivalensét reakcióba vittük a **16 – 19** festékekkel. Megmértük a termékek fluoreszcencia-változását a peptidet nem tartalmazó kontrolmintához képest, és 12-, 28-, 39-, illetve 11-szeres serkentési értékeket detektáltunk (7. ábra, 3. táblázat). Legjobb tudásunk szerint az irodalomban jelenleg ezek a legnagyobb fluorogén jelleggel rendelkező cianinok.

Festék	^a I _{bisz-klíkk} / I _{biszazid}	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	^b $\Phi_{bisz-klíkk}$
15^c	13	410	487	0,0065
15^d	34	410	487	0,018
16^d	12	560	577	0,16
17^d	28	560	573	0,85
18^d	39	550	565	0,21
19^d	11	555	569	0,14

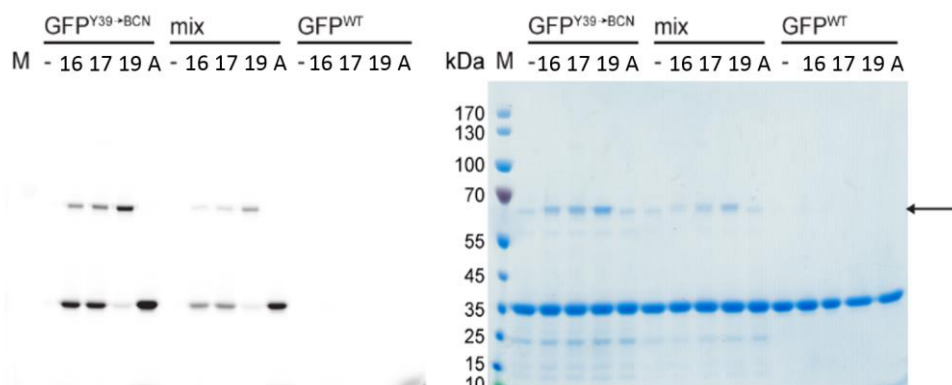
3. táblázat. A 15-19 festékek fotofizikai paramétereit, fluoreszcencia-serkentési értékeik két SPAAC-t követően, illetve a kialakult és a kiinduló vegyületek kvantumhasznosítási tényezői. ^aPBS, c = 0,625 μ M, rt, két órányi reakcióidő után. ^bKvantumhasznosítási tényezők a Kumarin 153 (**15**) vagy a Rodamin B (**16-19**) festékekhez viszonyítva. ^c(BCN)KAEAAK(BCN) modellpeptiddel mérve. ^d**P2** modellpeptiddel mérve.



7. ábra. A 16-19 festékek P2-vel képzett konjugátumainak fluoreszcenciája, illetve a kontrolmintához képest számított fluoreszcencia-serkentések összehasonlítása.

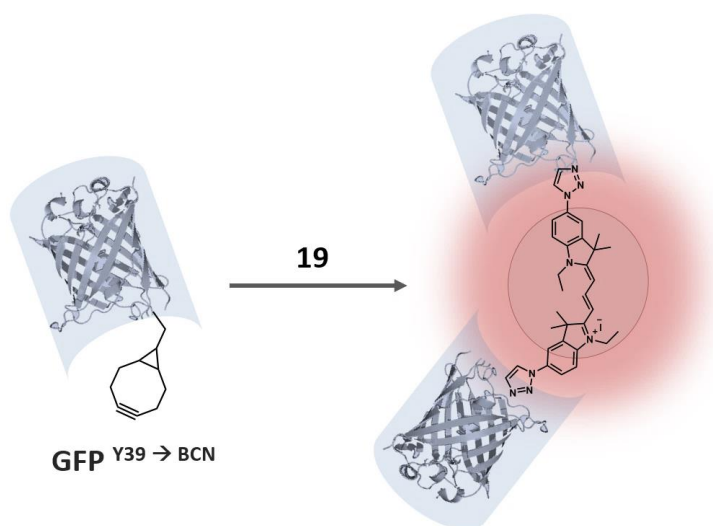
5. Cianinok alkalmazása kovalens fehérje-keresztcsatlóként

Az elkészült fehérjéket jelölésnek vetették alá kétszeres mennyiségű biszazid-festékkel. A kísérletsorozatból kizárásra került a 15-ös és a 18-as festék, nem megfelelő oldhatóság, illetve nagyfokú nem-specifikus tapadási hajlam okán. A jelölt fehérjék SDS-PAGE analízise azt mutatta, hogy minden esetben egy intenzíven fluoreszcens sáv jelent meg a gélen GFP^{Y39→BCN} kétszeres tömegénél, míg a kontrolként alkalmazott TAMRA-N₃ festékekkel csak az egyszeresen jelölt GFP^{Y39→BCN} sávja jelentkezett. Fluoreszcencia-intenzitások alapján a 16-os és a 17-es festékek esetében az egyszeresen jelölt GFP^{Y39→BCN} volt a főtermék, nem a keresztcsatló.



8. ábra. A 16, 17, 19 festékekkel jelölt GFP^{Y39→BCN} fluoreszcens (balra) és a megfelelő Coomassie-festett (jobbra) SDS-PAGE analízise. Az első oszlop (-) mindkét esetben a festék nélküli fehérjét tartalmazza. Az utolsó oszlop (A) a kontrolként alkalmazott TAMRA-N₃ sávjait tartalmazza. A fekete nyíl a GFP dimer helyét jelzi a gélen.

Ezzel szemben a **19**-es festék esetében szinte kizárólag csak a keresztkapcsolt fehérjére jellemző intenzíven fluoreszcens sáv volt detektálható. A vad-típusú GFP^{WT} esetében nem jelentkezett fluoreszcencia. Az 1: 1 arányban vad típusú és mutáns GFP^{Y39→BCN}-t tartalmazó keverék jelölése ugyanazokat az eredményeket mutatta, mint a GFP^{Y39→BCN}, de feleakkora fluoreszcencia-intenzitásértékekkel (9.ábra)



9.ábra. A **19**-es festék fluorogén keresztkapcsolóként rögzít két GFP-egységet

A kutatás eredményeit összefoglaló publikációk:

O. Demeter, A. Kormos, C. Koehler, G. Mező, K. Németh, E. Kozma, L. Takács, E. Lemke, P. Kele, *Bioconjugate Chemistry* **2017**, 28, 1552-1559.

O. Demeter, E. Fodor, M. Kállay, G. Mező, K. Németh, P. Szabó, P. Kele, *Chemistry - A European Journal* **2016**, 22, 6382-6388.

-
1. R. Joswik, A. A. Dalinkevich, *Chemistry And Chemical Biology*, 1st ed., Apple Academic Press Inc, **2014**.
 2. G. B. Cserép, A. Herner, P. Kele, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, 3, 042001.
 3. L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 855–866
 4. B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 281, 269–272.
 5. A. Pomorski, A. Krężel, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1152–1167.
 6. M. Levitus, S. Ranjit, *Q. Rev. Biophys.* **2011**, 44, 123–151.