

ZÁRÓ BESZÁMOLÓ AZ OTKA-K 100134
BIOORTOGONÁLIS JELÖLÉSRE ALKALMAS FLUORESZCENS REAGENSEK SZINTÉZISE CÍMŰ
PÁLYÁZATHOZ

A) Ciklooktinok fejlesztése

A témához kapcsolódóan sikerrel valósítottuk meg egy monobenzociklooktin származék (COMBO) szintézisét. Kinetikai vizsgálatok segítségével igazoltuk, hogy az eddig közölt ciklooktin-származékokkal való összehasonlításban sokkal hatékonyabb rézmentes azid-alkin típusú, biomolekulák jelölésére hatékonyan alkalmazható reagens. Lipofilitási indexe alapján is lényeges előrelépést jelent a korábbi reagenshez képest, amennyiben sokkal jobb vízdékonyságot tesz lehetővé. Munkánk során sikerrel valósítottuk meg e reagens fluoreszcensen módosított származékával (fluoreszcein és rodamin) sejtfelszíni glikoprotein struktúrák szelektív és hatékony jelölését élő sejteken (*Chemistry: a European Journal*, 2012), illetve együttműködés keretében, mesterséges, amfifil fehérjék önszerveződése során kialakult vezikulumok sejten belüli jelzését (*Nature Materials*, 2014). Ugyancsak e ciklooktint használtuk fel dezoxiuridin módosítására (dU-COMBO), amely származékot sikeresen építettünk be szilárd fázisú szintetikus eljárással oligonukleotidokba. Vizsgáltuk az így bioortogonalizált nukleinsavak jelölési lehetőségeit (*Chemical Communications*, 2014).

B) Közeli infravörös (NIR) tartományban emittáló, bioortogonalisan alkalmazható jelzővegyületek

Sikerrel valósítottuk meg a biológiai képletek jelölésére igen alkalmas közeli IR tartományban emittáló fluoreszcens jelzővegyületek előállítását, melyek azid, vagy alkin funkciós csoportjuk révén bioortogonalis jelzésre használhatók. Az egyik fluoreszcens jelzővegyület felhasználásával elkészítettünk egy daunomicin akcióméchanizmusának felderítésére alkalmas konjugátumot is melyben a festék hatékonyan törli le a daunomicin fluoreszcenciáját energiáttranszfer folyamat eredményeként. A daunomicin konjugátumból történő felszabadulása során annak fluoreszcenciája helyreáll, így a folyamat jól követhető (*Chemistry: an Asian Journal*, 2013).

C) Fluorogén jelzővegyületek szintézise

A témához kapcsolódóan sikerrel valósítottuk meg egy új, fluorogén jelzővegyület család előállítását. Szintetikus szempontból jelentős, hogy a jelzővegyületek moduláris felépítésűek, ezáltal nagyfokú variabilitást tesznek lehetővé, így a fotofizikai tulajdonságok finomhangolása is lehetséges. Spektrális szempontból különösen érdekes, hogy ez új jelzővegyületek ún. mega Stokes típusú molekulák, azaz gerjesztési és emissziós sávjuk maximuma több, mint 100 nm távolságban van egymástól. Az előállított vegyületek alkalmazhatóságát élő rendszerek jelzésével teszteltük, melynek során megállapítottuk, hogy alacsony háttérfluoreszcenciával rendelkeznek és akár a sejtlízis körülményei közt is alkalmazhatók. Eredményeinkről két publikációban adtunk számot (*Organic and Biomolecular Chemistry*, 2013 és *Bioconjugate Chemistry*, 2014).

D) Reaktív tetrazinszármazékok fejlesztése

A támogatási időszakban sikerrel valósítottuk meg elektronban szegény tetrazinszármazékok szintézisét. Előállítottunk három, különböző szubsztituensekkel ellátott tetrazinszármazékot és vizsgáltuk ezek reaktivitását különböző dienofilekkel (etil-vinil éter, ciklooktin, *transz*-ciklooktén). Megállapítottuk, hogy a tetrazinok reaktivitása nemcsak az elektronikus hatásoktól (LUMO energia), hanem a szterikus faktoroktól is nagymértékben függ. E megfigyeléseket elméleti számításokkal is igazoltuk. Jelenleg az egyik, legstabilabb tetrazinszármazék nukleotidba való beépítése folyik. A sikeres szintézist követően megvizsgáljuk az így módosított dUTP nukleinsavakba építését enzimátikus folyamat eredményeként.

E) Biolumineszcens jelzővegyületek

Sikerrel valósítottuk meg olyan biolumineszcens jelzővegyületek előállítását, melyek a természetes (Luciferin) származékhoz képest más hullámhosszú emissziós maximummal rendelkeznek. Ezt a természetes luciferin váz benzotiazol-moduljának más heterociklusra való cseréjével értük el. Ugyancsak sikeresen valósítottuk meg azid szubsztituenssel tompított biolumineszcens vegyületek előállítását. E vegyületek labilitása, illetve alacsony intenzitású biolumineszcenciája azonban nem tette lehetővé az ilyen típusú jelzőanyagok további, *in vivo* körülmények közti vizsgálatát, így ezt a kutatási témát leállítottuk.

F) Genetikailag kódolható kémiai hírvivők előállítása

Sikerrel valósítottuk meg tetrazol, tetrazin, ciklooktin és *transz*-ciklooktén funkciós csoportot hordozó aminosavak (Lys) előállítását, melyek genetikai kódolása jelenleg folyamatban van. Sikeres beépülést követően tervezzük e nem természetes aminosav modulok szelektív jelölését.

G) Tyr és Cys specifikus kémiai hírvivők szintézise

Előállítottunk különféle bifunkciós tirozin-specifikus kémiai hírvivőket, melyek alkalmazásával sikerrel valósítottuk meg egy modellfehérje tirozinon keresztüli fluoreszcens jelzését. Az eredményeket publikációban foglaltuk össze (*Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2013).

Új, vinil-szulfon motívumot tartalmazó kémiai hírvivők segítségével cisztein tartalmú peptidek helyspecifikus jelölését valósítottuk meg. Szekvenciális jelölési eljárásban fluorogén festékek felhasználásával demonstráltuk, hogy lehetséges biomolekulák alacsony háttérfluoreszenciával járó tiolspecifikus jelölése (*Tetrahedron*, 2014).

A tervezett munka nagy részét sikeresen valósítottuk meg, ahol indokolt volt, ott más megoldási javaslatot tettünk (pl. ciklooktinok alkalmazása és előállítása helyett fokozatosan áttértünk a *transz*-ciklookténokra).

A támogatási időszakban az alábbi közlemények születtek (9 tudományos közlemény, ebből 7-ben lett feltüntetve az OTKA támogatás, össz-impakt faktor: **69,596**, 39 független hivatkozás):

- Varga BR, Kallay M, Hegyi K, Szabolcs B, Kele P: ***A non-fluorinated monobenzocyclooctyne for rapid copper-free click reactions***, CHEMISTRY-A EUROPEAN JOURNAL 18:(3) pp. 822-828., 2012
- Cserép G B, Herner A, Wolfbeis O S, Kele P: ***Tyrosine specific sequential labeling of proteins***, BIOORG MED CHEM LETT 23: 5776-5778, 2013
- Herner A, Nikic I, Kállay M, Lemke E A, Kele P: ***A new family of bioorthogonally applicable fluorogenic labels***, ORG BIOMOL CHEM 12: , 2013
- Cserép GB, Enyedi KN, Demeter A, Mezo G, Kele P: ***NIR mega-Stokes fluorophores for bioorthogonal labeling and energy transfer systems - An efficient quencher for daunomicyn***, CHEM-ASIAN J 8: (2) 494-502, 2013
- P Kele, X Li, A Duerkop: ***New luminescent ruthenium probes for detection of diacetyl***, MICROCHEM J 108: 156-160, 2013
- Cserép Balázs Gergely, Baranyai Zsuzsa, Komáromy Dávid, Horváti Kata, Bősze Szilvia, Kele Péter: ***Fluorogenic tagging of peptides via Cys residues using thiol-specific vinyl sulfone affinity tags***, TETRAHEDRON 70: 5961-5965, 2014
- Herner A, Girona G E, Nikić I, Kállay M, Lemke E A, Kele P: ***New Generation of Bioorthogonally Applicable Fluorogenic Dyes with Visible Excitations and Large Stokes Shifts***, BIOCONJUGATE CHEM 25: (7) 1370-1374, 2014
- Huber M C, Schreiber A, von Olshausen P, Varga BR, Kretz O, Joch B, Barnert S, Schubert R, Eimer S, Kele P, Schiller SM: ***Designer amphiphilic proteins as building blocks for the intracellular formation of organelle-like compartments***, NAT MATER 2015: (14) 125-132, 2014
- Stubinitzky C, Cserép GB, Bätzner E, Kele P, Wagenknecht HA: ***2'-Deoxyuridine Conjugated with a Reactive Monobenzocyclooctyne as a DNA Building Block for Copper-Free Click-type Postsynthetic Modification of DNA***, CHEM COMMUN : , 2014

Szóbeli előadások:

Külföldi, szóbeli előadások:

- Kele, P. Synthesis and applications of bioorthogonal reagents. *Ecole Normale Supérieur, Párizs*, meghívott előadás
- Kele, P. Synthesis and applications of bioorthogonal reagents. Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Invited lecture. Olmütz, 2013, szeptember 1.5.
- Kele, P. Synthesis and applications of bioorthogonal reagents. Karlsruhe Institute of Technology, meghívott előadás
- Kele, P. Synthesis and applications of bioorthogonal reagents. University of Freiburg, Meghívott előadás.

Nemzetközi, poszterelőadások:

- Cserép, G.; Stubinitzky, C.; Bätzner, E.; Wagenknecht, H.A.; Kele, P. Synthesis and application of bioorthogonalized nucleotides, EMBO, Chemical Biology, Heidelberg, 2014, augusztus 20-23.
- Demeter, O.; Kele, P. Synthesis of bioluminescent fluorogenic probes. EMBO, Chemical Biology, Heidelberg, 2014, augusztus 20-23.
- Herner, A.; Girona, G. E.; Nikić, I.; Kállay, M.; Lemke, E. A.; Kele, P., Fluorogenic Dyes: from computational studies to biological applications. EMBO, Chemical Biology, Heidelberg, 2014, augusztus 20-23.
- Kozma, E.; Söveges, B.; Kele, P. Synthesis and characterization of bioluminescent unnatural amino acids. EMBO, Chemical Biology, Heidelberg, 2014, augusztus 20-23.
- Herner, A., Kele, P. Development of azide containing fluorogenic dyes, Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Olmütz, 2013, szeptember 1-5.
- Cserép, B. G. , Demeter, O. Kele, P. Reactive tetrazines for rapid bioorthogonal ligation and in vivo labeling. Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Olmütz, 2013, szeptember 1-5.
- Kozma, E. Rodrigez, P., Varga, B. R., Paoletti, P., Triller, A., Ye, S., Kele, P. Bioorthogonal labeling of NMDA receptors via copper-free click chemistry. Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Olmütz, 2013, szeptember 1-5.

Hazai előadások: a fenti poszterelőadások témája szóbeli bemutatásra került az adott évben a Heterociklusos és Elemorganikus Munkabizottsági Ülésen (Balatonszemes, 2012, 2013, 2014).

A projektben előállított fluoreszcens és fluorogén vegyületek közül 8 vegyület már kereskedelmi forgalomban is hozzáférhető (Luminochem kft). Ez átlagosan évi 500,000 ft értékben történő rendelést jelent.