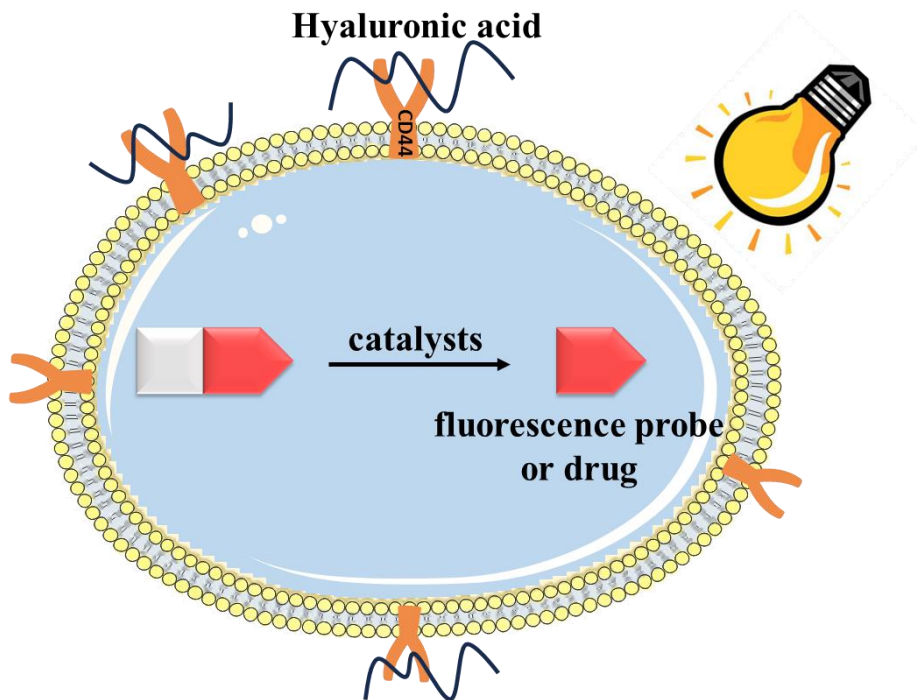


## **Samenvatting**

# **Fotokatalyse voor Toepassingen in Levende Cellen**

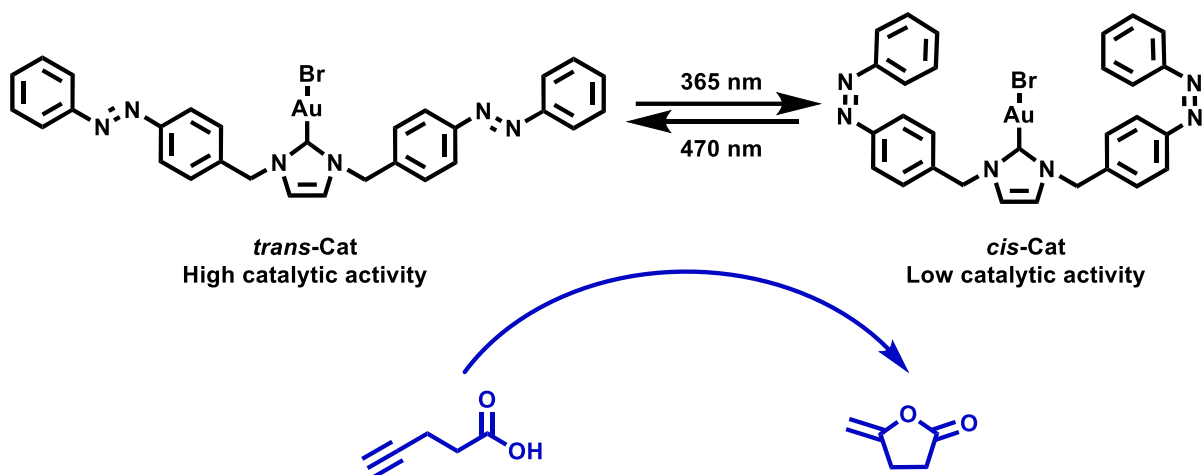
Bioorthogonale katalyse heeft zich ontwikkeld als een krachtig instrument om niet natuurlijke reacties in levende organismen uit te voeren. Hierdoor worden diverse biologische toepassingen mogelijk zoals beeldvorming via lokale fluorescentie, medicijnsynthese en het lokaal labelen van eiwitten. Hoewel er al overgangsmetaalkatalysatoren zijn gebruikt voor het katalyseren van reacties in levende cellen, zijn er nog verschillende uitdaging te overbruggen om chemische reacties met precieze controle in tijd en ruimte mogelijk te maken. Fotokatalyse biedt een strategie om reacties te katalyseren gecontroleerd in zowel tijd als ruimte ook binnen levende organismen, en is daarom een groeiend onderzoeksgebied. Voor deze strategie is de ontwikkeling van nieuwe fotokatalytische reacties die onder fysiologische omstandigheden werken nodig, alsmede de implementatie van fotokatalyse selectief gericht op kankercellen, en het gebruik van rood of nabij-infrarood licht (NIR) voor katalyse. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift betreft het ontwerpen van diverse overgangsmetaalkatalysatoren om efficiënte en licht-gecontroleerde katalyse mogelijk te maken, met een oog op de toepassing in kankercellen, met als veelbelovende toepassing de mogelijke behandeling van ziektes.

In **Hoofdstuk 1** bespreken we de stand van zaken en de uitdagingen op het gebied van bioorthogonale katalyse in levende organismen. De grootste uitdaging is het ontwikkelen van efficiënte, controleerbare katalytische reacties gericht op kankercellen. Overgangsmetaalkatalysatoren faciliteren de introductie van verschillende nieuwe reacties die uitgevoerd kunnen worden in cellen, maar de uitdaging is ervoor te zorgen dat deze reacties een hoge efficiëntie hebben. Fotokatalyse, door het gebruik van licht met verschillende golflengtes, biedt temporale en ruimtelijke controle over de reactie in termen van snelheid, opbrengst en selectiviteit. Dit maakt de controleerbare synthese van fluoroforen en geneesmiddelen in levende cellen mogelijk is. Daarnaast biedt het gebruik van het polymeer hyaluronzuur een manier om selectief verbindingen te leveren aan kankercellen. Deze gerichte strategieën kunnen in principe off-target effecten minimaliseren, zoals de toxiciteit voor normale cellen en het leidt bovendien tot een meer efficiënt gebruik van reagentia (Figuur 1). Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is om katalytische systemen te ontwerpen die gestuurd kunnen worden met externe lichtstimuli en selectief afgegeven kunnen worden aan kankercellen, om zo maximale controle van chemische reactie in cellen mogelijk te maken.



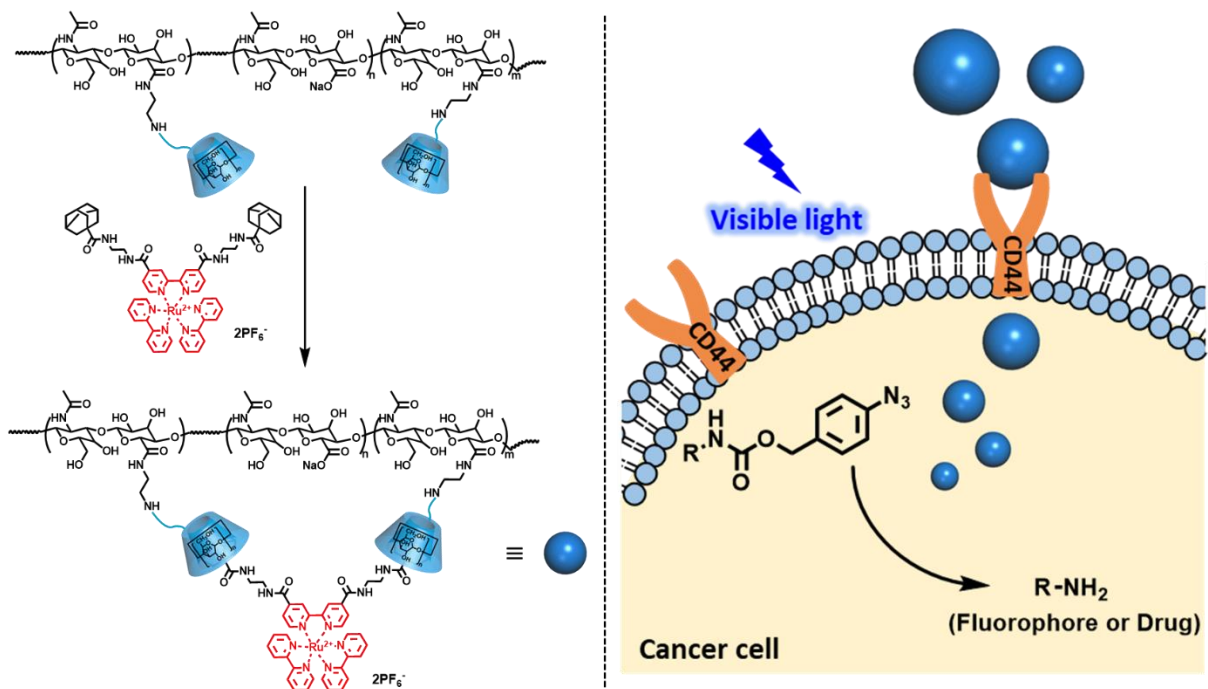
**Figuur 1.** Fotokatalyse in kankercellen voor het lokaal maken van fluorescente moleculen en medicijnen, zoals besproken in Hoofdstuk 1.

In **Hoofdstuk 2** rapporteren we een met licht schakelbare katalysator, ontworpen om ringsluitingsreacties onder milde omstandigheden te bewerkstelligen. Een goudkatalysator met een azobenzeen-bevattende N-heterocyclische carbeen eenheden werd ontworpen en gesynthetiseerd. De katalysator kan reversibel worden omgeschakeld tussen de *trans*- en *cis*-isomeren door gebruik te maken van UV en zichtbaar licht, en deze configuraties blijven stabiel tijdens het reactieproces (Figuur 2). Omdat de *trans*-Cat bijna twee keer de katalytische activiteit vertoont in vergelijking met de *cis*-Cat tonen we aan dat het een schakelbare katalysator is. DFT-berekeningen suggereren dat de *trans*-Cat gunstiger is voor substraatbinding, aangezien de *cis*-Cat minder ruimte heeft rondom het metaal centrum voor substraat coordinatie. Fotoschakelbare metaalkatalysatoren maken de ruimtelijke en temporele controle van katalytische reacties mogelijk, met aanzienlijke implicaties voor verschillende toepassingen, waaronder het ontwerp van slimme medicijnen en andere biologische processen.



**Figuur 2.** Fotoschakelbare katalysator voor het reguleren van de reactieve eigenschappen van cyclisatiereacties in Hoofdstuk 2.

De azide-reductiereactie is een belangrijke reactie voor de toepassing van fotokatalyse in levende cellen vanwege de lage toxiciteit en biologische inertie van azide-bevattende substraten. In **Hoofdstuk 3** richtten we ons op de activering van pro-probe en prodrug moleculen door een fotokatalytische reductiereactie gebruikmakend van zichtbaar licht. Hiertoe wordt een ruthenium gebaseerde fotokatalysator selectief afgeleverd aan kankercellen met behulp van een gefunctionaliseerde polysaccharide polymeer. Het hyaluronzuur van het polysaccharide polymeer is gefunctionaliseerd met  $\beta$ -cyclodextrine moleculen, die de fotokatalysator kan binden via de adamantaan groep van een analoog van de tris(bipyridine)ruthenium(II)-katalysator. Het polysaccharide hyaluronzuur richt zich selectief op kankercellen, en de gebonden adamantaan-gefunctionaliseerde katalysator kan zo selectief worden afgegeven. Onder bestraling met zichtbaar licht reduceert de ruthenium gebaseerde fotokatalysator de azide in het pro-probe molecuul om zo rhodamine als fluorescerende probe te produceren. Op een vergelijkbare manier kan onder fysiologisch relevante omstandigheden ook een anticancer-medicijn worden gegenereerd door conversie van de azidegroep naar een aminegroep. Katalytische experimenten uitgevoerd in levende cellen tonen aan dat het ruthenium complex selectief kankercellen binnengaat en dat na bestraling met zichtbaar licht rhodamine wordt gevormd. Een vergelijkbare omzetting van prodrug naar het medicijn doxorubicine veroorzaakt de dood van kankercellen (Figuur 3). Deze strategie van fotokatalytische activering van een prodrug biedt ruimtelijke en temporele controle over de synthese van antikankermedicijnen selectief in kankercellen, en opent de weg naar de ontwikkeling van zeer selectieve medicijnen.

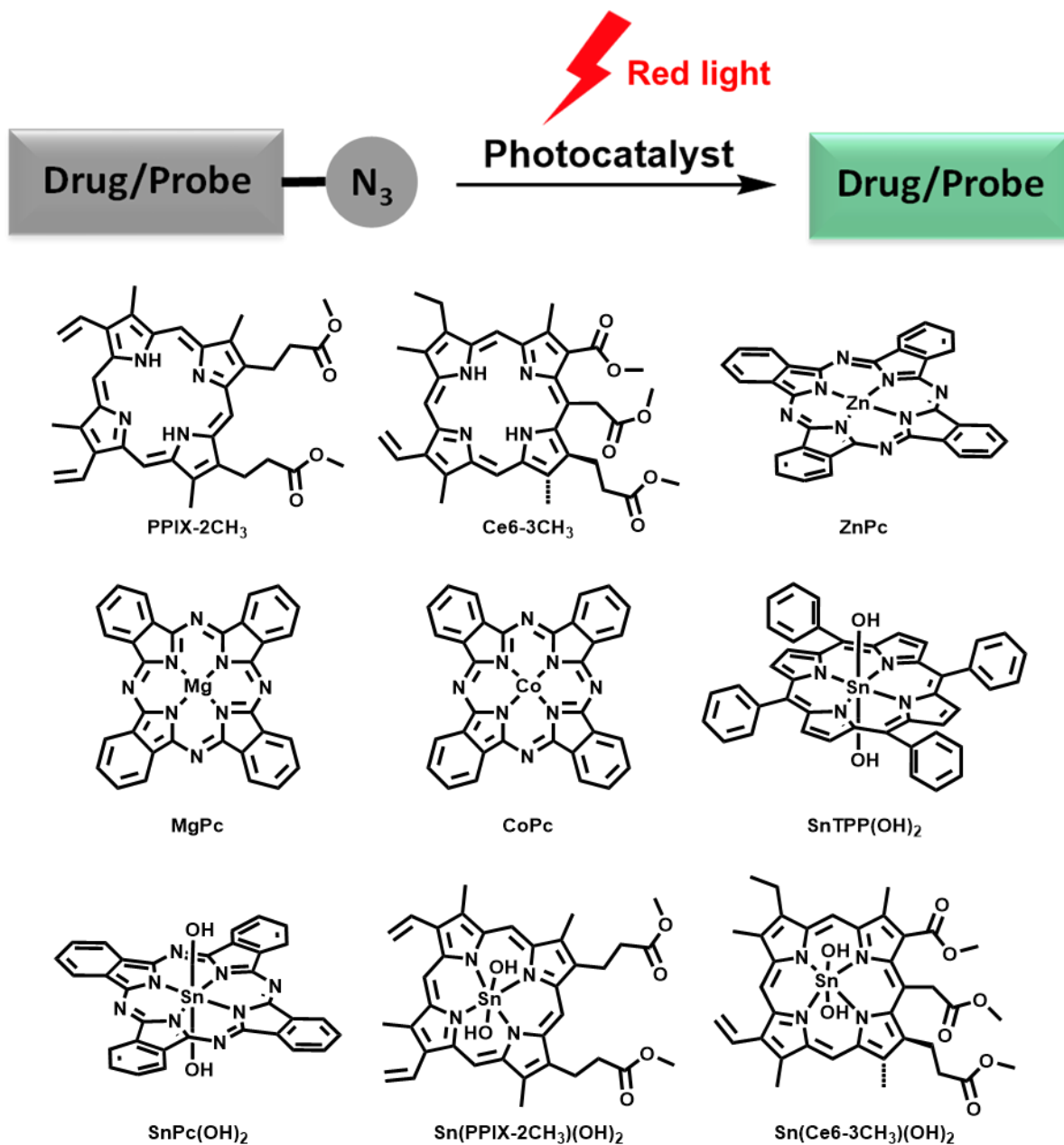


**Figuur 3.** De conversie van een pro-probe en een prodrug, geïnduceerd door zichtbaar licht, met behulp van een  $Ru(bpyAda)(bpy)_2CHACD$  supramoleculaire fotokatalysator selectief afgeleverd aan kankercellen, zoals beschreven in Hoofdstuk 3.

Het principe van fotokatalyse in levende cellen is beschreven in **Hoofdstuk 3**, waarbij gebruik werd gemaakt van blauw licht. In het vervolg van het onderzoek streven we ernaar om rood licht of NIR-licht te gebruiken voor het katalyseren van azide-reductiereacties in levende cellen. Het rode licht heeft grote voordelen ten aanzien van het gebruik van het blauwe licht, zoals lagere biologische toxiciteit en het vermogen om dieper door te dringen in weefsels of tumoren. De belangrijkste uitdaging van rood licht-geïnduceerde fotokatalyse is het ontwikkelen van efficiënte fotokatalysatorsystemen. Deze kunnen in principe op twee manieren worden gemaakt: 1) metaalcomplexen en kleurstof moleculen die direct rood licht absorberen voor fotokatalyse en 2) indirecte methoden waarbij rood met behulp van up-conversie wordt geconverteerd naar hoge energie blauw licht. In **Hoofdstuk 4** bespreken we de directe methode en rapporteren diverse overgangsmetaalcomplexen en organische kleurstoffen die rood licht direct kunnen absorberen. In **Hoofdstuk 5** wordt een indirecte methode besproken, waarbij de upconversie van laag-energetische NIR-lichtfotonen naar hoog-energetische zichtbare lichtfotonen wordt bewerkstelligd met lanthanide upconversion-nanodeeltjes, welke in combinatie met ruthenium gebaseerde fotokatalysatoren leiden tot fotoreductie katalyse.

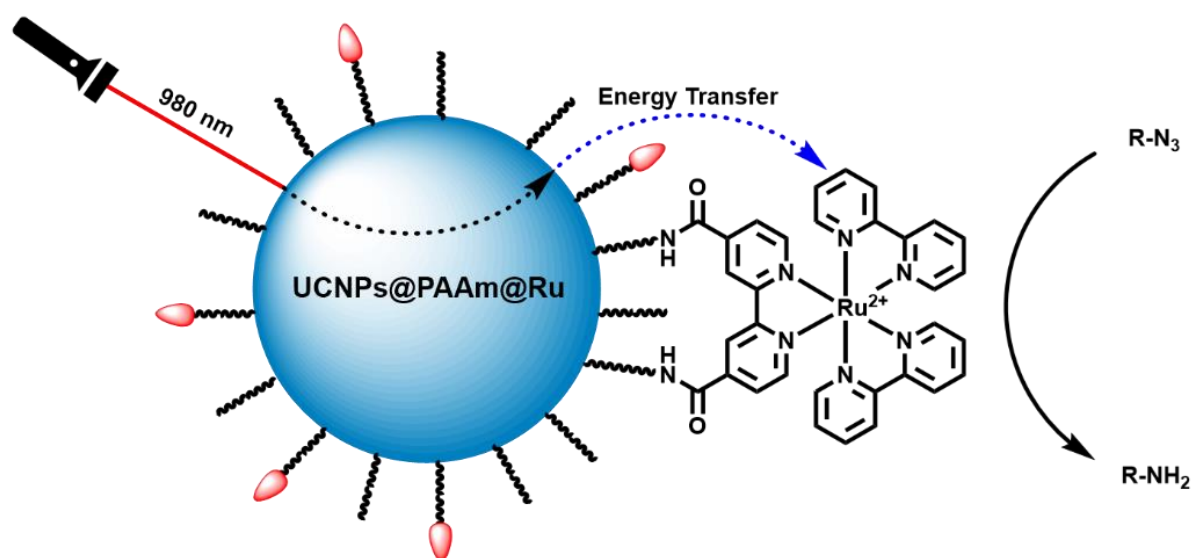
In **Hoofdstuk 4** rapporteren we het onderzoek naar fotokatalysatoren die direct worden geactiveerd door rood licht om de rhodamine probe te produceren onder fysiologisch relevante omstandigheden. Deze fotokatalysatoren vertonen een goede absorptie van rood licht en laten variërende katalytische activiteiten zien voor de omzetting van het rhodamine-azide substraat bij gebruik van verschillende reductiemiddelen, zoals NaAsc, GSH en NADH en onder het beschijnen met 640 nm rood licht. Fotokatalysatoren PPIX-2CH<sub>3</sub>, Ce6-3CH<sub>3</sub>, ZnPc, MgPc, CoPc and SnTPP(OH)<sub>2</sub>, SnPc(OH)<sub>2</sub>, Sn(PPIX-2CH<sub>3</sub>)(OH)<sub>2</sub> and Sn(Ce6-3CH<sub>3</sub>)(OH)<sub>2</sub> vertonen een hoge katalytische activiteit voor de omzetting van rhodamine azide (Figuur 4). In

verschillende reacties leidt de aanwezigheid van lucht (zuurstof) tot een afname van de omzetting, hoogstwaarschijnlijk omdat het fungeert als een donor van de geëxciteerde toestand. Om de toepassing van deze fotokatalysatoren binnen levende cellen te vergemakkelijken, werd een supramoleculaire strategie gebruikt om fotokatalysatoren, gefunctionaliseerd met adamantaan, te binden aan hyaluronzuur-polymeren die  $\beta$ -cyclodextrine-eenheden bevatten. Dit om de wateroplosbaarheid te verbeteren, de compatibiliteit met lucht te vergroten en de mogelijkheid te creëren om ze selectief aan kankercellen toe te dienen. Helaas heeft deze strategie nog niet geleid tot efficiënte omzettingen onder fysiologische omstandigheden. Desalniettemin leggen de resultaten een basis voor toekomstige biologische toepassingen met betrekking tot door rood licht geïnduceerde katalyse in levende cellen.



**Figuur 4.** Fotokatalyse van azide-reductiereacties met rood licht en de structuren van katalytisch actieve fotokatalysatoren zoals gerapporteerd in Hoofdstuk 4.

In **Hoofdstuk 5** werd indirecte fotokatalyse met NIR-licht voor de azide-reductiereactie onderzocht door gebruik te maken van upconversie nanodeeltjes. Een fotokatalysator voor zichtbaar licht werd covalent gekoppeld aan lanthanide upconversie nanodeeltjes *via* een condensatiereactie met het poly(allylamine) dat aan de buitenkant van het nanodeeltje zit. Hierdoor krijg je een NIR-geïnduceerd katalytisch systeem. Belangrijk is dat de absorptie van de ruthenium-gebaseerde fotokatalysator en de emissie van het upconversie nanodeeltje een aanzienlijke spectrale overlap vertonen. Effectieve energieoverdracht van de upconversie nanodeeltjes naar de fotokatalysatoren vindt plaats vanwege de gunstige spectrale overlap en de ruimtelijke nabijheid, wat mogelijkheden biedt voor het katalytisch fotoreductie proces (Figuur 5). De azide-reductie reactie om de rhodamine te genereren werd uitgevoerd met 980 nm NIR-licht. Zo werd een aanzienlijke omzetting verkregen, hetgeen de werking van het concept bewijst. De waargenomen katalytische efficiëntie is nog te laag voor toepassingen, mogelijk als gevolg van de lage efficiëntie van energieoverdracht. Als de katalytische efficiëntie beter is dan heeft deze strategie potentie voor toepassing voor NIR-licht geïnduceerde organische synthese van fluorescerende moleculen of medicijnen in levende cellen.



**Figuur 5.** Indirecte NIR-fotokatalyse door de koppeling tussen lanthanide upconversie-nanodeeltjes en een rutheniumfotokatalysator, actief bij azide-reductiereacties onder 980 nm NIR-lichtbestraling, zoals gerapporteerd in Hoofdstuk 5.

Het centrale thema in dit proefschrift is licht gecontroleerde katalyse voor toepassingen in levende cellen. We hebben nieuwe fotokatalytische reacties onderzocht en toegepast onder fysiologische omstandigheden, met zichtbaar blauw licht alsmede rood licht en NIR-licht. De resultaten van het in dit proefschrift beschreven onderzoek dragen bij aan de ontwikkeling van efficiënte, en met licht controleerbare katalytische systemen, die nieuwe methodes oplevert om ons begrip van biologische processen te verdiepen en bij te dragen aan de behandeling van ziektes.