Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Compuestos enjaulados para la regulación de la expresión de genes

Filevich, Oscar

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Filevich, Oscar. (2011). Compuestos enjaulados para la regulación de la expresión de genes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Filevich, Oscar. "Compuestos enjaulados para la regulación de la expresión de genes". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Compuestos Enjaulados para la Regulación de la Expresión de Genes

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física.

Oscar Filevich

Director de Tesis: Dr. Roberto Etchenique

Consejera de Estudios: Dra. Lelia Dicelio

Buenos Aires, 2011.

COMPUESTOS ENJAULADOS PARA LA REGULACION

DE LA EXPRESION DE GENES

En este trabajo se extiende la tecnología de fotoliberadores de moléculas biológicamente interesantes activables con luz visible basados en bipiridinas de rutenio, inicialmente desarrollada en nuestro laboratorio. Se caracterizan algunas propiedades de fotoliberadores de moléculas de importancia biológica, coordinados a rutenio a través de grupos poco básicos como nitrilos o tioéteres. Se describen algunas propiedades de dos de ellos: Un fotoliberador de un fluoróforo derivado de rodamina cuya fluorescencia disminuye en su estado coordinado y es recuperada al ser fotoliberado; y un fotoliberador de una molécula pequeña capaz de controlar la síntesis de proteínas por el operón lactosa, como demuestran los bioensayos en *E. coli*. La capacidad para proteger y fotoliberar estos grupos funcionales junto con la posibilidad de funcionalizar superficies con fotoliberadores y microirradiarlas a escala subcelular con un microscopio adaptado a tal fin, extienden la utilidad de estas herramientas para responder preguntas actuales y relevantes.

Palabras claves: Compuestos enjaulados, complejos de rutenio y bipiridinas, superficies fotosensibles, efecto antena, regulador de la expresión génica, complejos con nitrilos, complejos con tioéteres, operon lactosa.

CAGED COMPOUNDS FOR THE CONTROL

OF GENE EXPRESSION

In this work we further extend the technology of visible-light phototriggers for biologically relevant biomolecules, which was originally developed in our lab. We characterize some properties of molecules with biological importance which, through low-basicity groups like nitriles or thioethers, coordinate ruthenium-bipyridine complexes yielding caged-compounds which can be released with low-energy visible light. The properties of two of them are studied to some detail: a phototrigger of a modified rhodamine that is a fluorescence quencher: rhodamine's full fluorescence is recovered upon photorelease. The second one is a phototrigger for a small-molecule which can control genetic systems under *lac* operon regulatory elements, as shown by *E. coli* bioassays. As a proof-of-concept, the chemical modification of surfaces with a ruthenium caged-compound is shown, toghether with the optical instrument constructed for controlling photouncageing at a sub-cellular scale. These ruthenium-bipyridine based tools extend the functions available through biomolecule and small-molecule visible-light phototriggers.

Keywords: Caged compounds, ruthenium bipyridines, photosensitive surfaces, antenna effect, gene expression regulators, complexes ontaining nitriles, complexes ontaining thioethers, lactose operon.

Índice

Organización de la tesis....11

Introducción general....13

Compuestos de coordinación....13

Compuestos de rutenio....14

Compuestos enjaulados....19

Objetivos generales....23

Capítulo 1: Superficies Fotoactivables....25

Introducción....25

Grupos protectores orgánicos. 27

Grupos protectores inorgánicos. 31

Materiales y Métodos 33

Construcción de un setup para microfotolitografía....33

Síntesis de [Ru(bpy)2(APTS)Cl]+....36

Funcionalización de superficies....37

Con grupos protectores inorgánicos....37

Con grupos protectores orgánicos....38

Resultados y discusión. 39

Uso del setup para microfotolitografía. 39

Modificación fotoquímica de superficies....45

Capítulo 2: Grupos protectores para nitrilos....53

Introducción....53

Nitrilos en moléculas fisiológicamente interesantes....53

Materiales y Métodos.....57

Setup para espectroscopía UV-Vis y fotolisis a temp. constante.....57

Método de Deconvolución de espectros.....58

Síntesis de complejos de la forma [Ru(bpy)2 X L]+2.....60

Síntesis del complejo [Ru(bpy)2Cl(RhodMAPN)]+.....61

Procedimiento para analizar y medir velocidades de fotólisis: 62

Resultados y discusión. 65

Complejos de rutenio conteniendo nitrilos.....65

Transferencia de energía y efecto antena. 73

Modelo FRET de transferencia de energía.....76

Capítulo 3: Regulación de genes con luz.....83

Introducción.....83

Materiales y Métodos.....88

Síntesis de [Ru(bpy)2 (PMe3) (MTG)]+2.....88

Intercambio iónico.....88

Cultivos y manipulación de Escherichia coli.....89

Revelado de la actividad enzimática.....92

Resultados y discusión. 94

Síntesis de reguladores génicos con tioéteres enjaulados.....94

Bioensayos. Regulación de genes con luz.....101

Conclusiones Generales.....108

Apéndices.....116

Agradecimientos.....116

Artículos Publicados.....117

Capítulos de libros.....117

Artículos Enviados.....118

Artículos en preparación.....118

Referencias.....120

Organización de la tesis.

Esta tesis describe tres líneas principales de trabajo: la aplicación de grupos protectores inorgánicos fotoactivables a superficies (capítulo 1), la incursión en complejos para coordinar grupos poco electrodonores, como nitrilos (capítulo 2), y tioéteres (capítulo 3) donde también se trata la aplicación los compuestos enjaulados a la regulación de genes con luz.

Luego de una introducción general, estos tres temas serán descriptos cada uno con su introducción específica, descripción de materiales y metodología utilizada, y presentación de resultados y su discusión inmediata, dejando una última sección para la discusión y conclusiones globales, de modo que puedan ser leídos en cualquier orden sin por ello comprometer la comprensión de la teoría en que se basan y los resultados obtenidos en cada uno. Se eligió este formato porque facilitó la descripción (y la comprensión, espero) de los distintos abordajes elegidos y sus resultados.

Introducción general

Compuestos de coordinación.

Una parte importante de la investigación en química inorgánica moderna está centrada en comprender el comportamiento, ajustar las propiedades, y desarrollar aplicaciones de compuestos de coordinación. Este interés se debe en parte a la importancia biológica y de las reacciones en las que participan compuestos de coordinación, las propiedades de los materiales resultantes, y las nuevas tecnologías desarrolladas gracias a ellos.

Los compuestos de coordinación, también llamados "compuestos complejos", o simplemente "complejos" consisten esencialmente en un átomo metálico, capaz de aceptar densidad electrónica, unido a átomos o moléculas que tienen densidad electrónica disponible.

Muchas biomoléculas contienen complejos metálicos como componentes escenciales de su estructura y/o función, y en general se las conoce como metaloproteínas. Ejemplos de éstas son las proteínas que actúan como factores de transcripción que incluyen motivos "dedos de cinc" (*Zn-fingers*) [1], enzimas relacionadas con reacciones fotosintéticas en cloroplastos y respiratorias en mitocondrias [2], como la superóxido dismutasa que coordina cinc y cobre [3]; el grupo hemo en la sangre es un compuesto de coordinación con hierro, y Ca^{+2}-calmodulina es una proteína regulatoria con afinidad por calcio, por nombrar las más presentes. Por otro lado, muchas aplicaciones tecnológicas aprovechan las propiedades de complejos, que suelen ser coloreados y con características fotoquímicas que dependen de su entorno, por lo que son útiles en química analítica.

También se usan compuestos de coordinación, por ejemplo, para favorecer la separación electrón-hueco en aplicaciones fotovoltaicas [4]. En tecnología biomimética como la fijación de N_2 atmosférico [5] ó la catálisis de la oxidación de agua tanto la solución evolutiva como la racional involucran compuestos de coordinación[6, 7]. En la industria farmacéutica, donde se buscan interacciones moleculares muy específicas, se usan como citostáticos.[7] Es evidente que existen infinidad de variantes y aplicaciones posibles en los que participan compuestos de coordinación.

En este trabajo se describirá específicamente la aplicación de complejos de rutenio conteniendo bipiridinas a la tecnología de *compuestos enjaulados* (*caged compounds*). Esta tecnología consiste, en términos generales, en la inactivación de una molécula mediante su unión a un fragmento fotorremovible para luego poder reactivarla con luz. El fragmento fotorremovible no tiene por si mismo actividad en el sistema en el que será usado, y la molécula inactivada recupera su identidad original al ser fotoliberada. Esto permite liberar moléculas en volúmenes extremadamente pequeños, con excelente precisión temporal y espacial, de un modo no invasivo.

Compuestos de rutenio.

El rutenio, como los demás metales de transición, tiene la capacidad de formar complejos al actuar como un ácido de Lewis aceptando densidad electrónica. [2] Una base de Lewis que done dichos electrones puede unirse al metal formando un "complejo". Se dice en una simplificación que un ligando que cede densidad electrónica es la base de Lewis que coordina al metal (ácido) al formar un complejo ó compuesto de coordinación. Los compuestos usados en este trabajo son complejos de

rutenio, dos bipiridinas, un ligando modulador de las propiedades (X) y un ligando fotolábil (L) (complejos que serán llamados Ru-bpy en general) de la forma $[Ru(bpy)_2XL]^{n+}$ donde (bpy)=2,2'-bipiridina y X y L son dos ligandos monodentados. La figura 1 muestra como ejemplo al $[Ru(bpy)_3]^{+2}$.

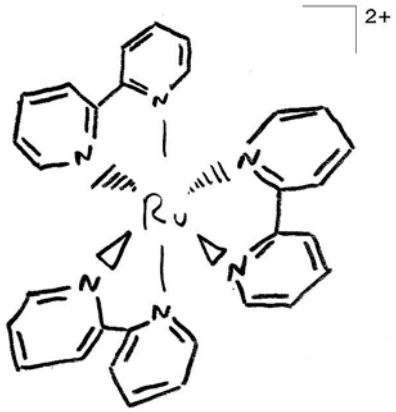


Figura 1: $[Ru(bpy)_3]^{+2}$ compuesto de coordinación de Ru(II) con muchas de las características fotoquímicas de los complejos usados en este trabajo, de la forma $[Ru(bpy)_2XL]^{n+}$

Las propiedades fotoquímicas de estos compuestos dependen de las transiciones electrónicas posibles, las que a su vez dependen de la estructura de orbitales moleculares del complejo.

Los orbitales moleculares resultan de la combinación de orbitales del rutenio y orbitales de las bipiridinas. En las bipiridinas, existen orbitales enlazantes donores σ localizados en los nitrógenos, y orbitales enlazantes donores π y antienlazantes aceptores π* deslocalizados en los anillos aromáticos. Esto resulta en una estructura de orbitales con niveles de energía como la que se ilustra en la figura 2. Puede apreciarse que una de las consecuencias de la formación del complejo es que existen transiciones electrónicas que son posibles en el complejo (indicadas con flechas en la fig. 2), pero que no existen en los reactivos originales. Las transiciones posibles se denominan MC (metal centered, también llamada d-d) si se dan entre orbitales *d* de carácter esencialmente metálico; LC (ligand centered) si los orbitales son esencialmente de los ligandos, y MLCT (metal to ligand charge transfer, ó transferencia de carga de metal a ligando) si se dan desde orbitales del metal a

orbitales del ligando. Las energías de estas últimas resultan, para bipiridinas de rutenio, en el rango de la luz visible, y son muy útiles para caracterizar los efectos de los ligandos sobre la estructura de orbitales.

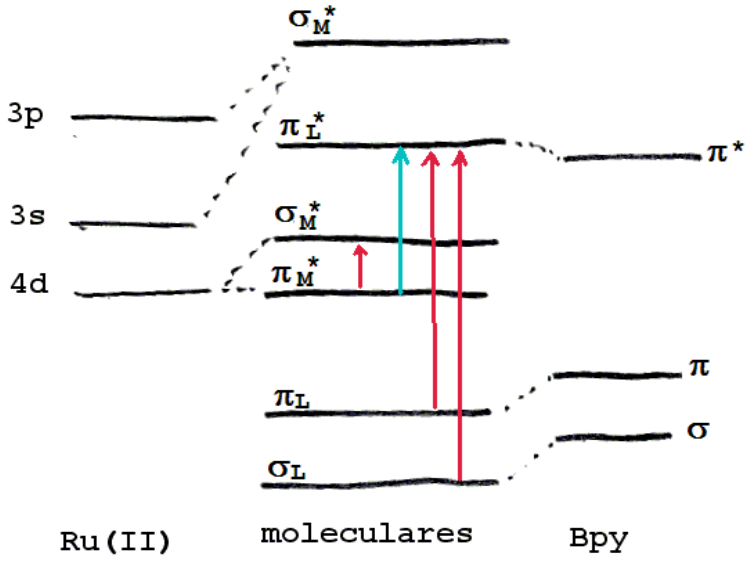


Figura 2: Orbitales 3p, 3s y 4d del metal Ru(II) ó de los ligandos bipiridina (Bpy), y orbitales moleculares resultantes. Éstos están marcados como: M de origen metálico ó L del ligando. Transiciones MC y LC en rojo, MLCT en azul.

Estas transiciones electrónicas pueden ser inducidas por absorción de luz. El espectro de absorbancia típico resulta de este conjunto de transiciones, y se muestra en la figura 3.

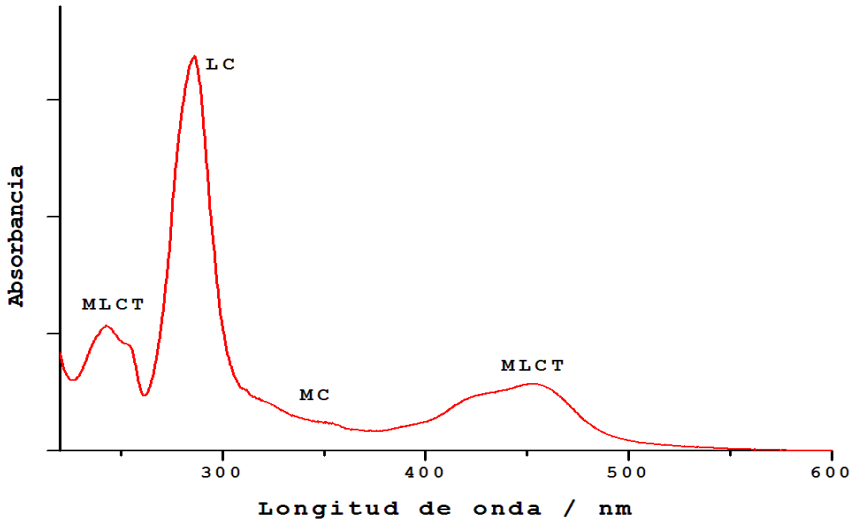


Figura 3: Espectro de absorbancia (u.a.) en UV-Vis de $[Ru(bpy)_3]^{+2}$ en acetonitrilo. Los máximos se asignan a las transiciones MC, LC, y MLCT descriptas.

Al absorber un fotón, un electrón pasa de su estado fundamental a un estado excitado, de mayor energía. En particular nos interesa la transición (o "banda de absorción") MLCT que está entre 400 y 500 nm en estos complejos (en azul en la fig.

2), pues es una manifestación de la energía requerida para excitar al sistema mediante un fotón, para transferir un electrón desde un orbital π de origen metálico (π_M) a un orbital π* antiligante esencialmente del ligando (π_L*) .

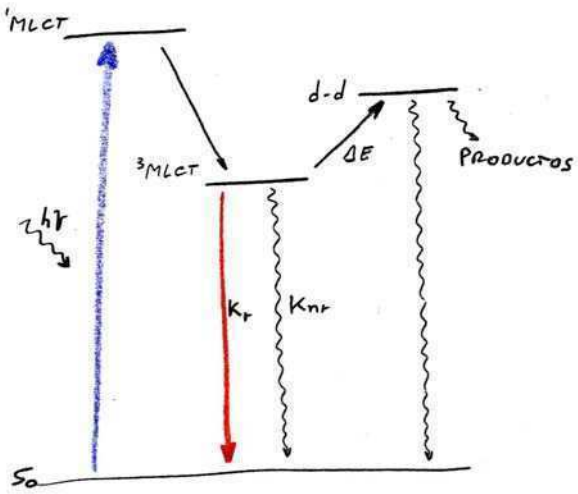


Figura 4: Diagrama de Jablonski simplificado de las transiciones más interesantes en $[Ru(bpy)_2XL]^{n+}$

En la figura 4 se esquematizan los estados del sistema Ru-bpy: la transición MLCT al absorber un fotón, y los eventos posteriores posibles con las constantes cinéticas asociadas. Normalmente el sistema se encuentra en su estado fundamental S_0. Al absorber un fotón con energía suficiente (unos 450 nm, azul) pasa a un estado singulete ^{1}MLCT producto de la transferencia de carga del metal al ligando.

Este estado es de vida media muy corta, de aproximadamente 100 fs. [8] por lo tanto inmediatamente ocurre un cruce entre sistemas (ISC, intersystem crossing) con muy alta eficiencia a un estado triplete ^{3}MLCT de vida media relativamente larga (varios ns). Este es el estado excitado de menor energía y desde aquí pueden ocurrir procesos redox bimoleculares, transferencia de energía, o luminiscencia.[9] Desde este estado el sistema puede volver al estado fundamental por vía no radiativa (k_{nr}) ó radiativa (k_r) emitiendo un fotón de unos 610 nm (anaranjado-rojo). También puede pasar térmicamente a un estado disociativo (*d-d*) cuya energía es ligeramente mayor que la del ^{3}MLCT. Desde este estado disociativo, el sistema puede perder su energía

por una transición no radiativa, o dar fotoproductos en una reacción de fotosubstitución, en la que rompe uno de sus seis enlaces de coordinación, que es con muy alta probabilidad el del ligando menos básico. Si el ligando en esa posición es monodentado y buen grupo saliente resulta reemplazado por (muy probablemente) una molécula de solvente. Debido a que la reacción es iniciada por la absorción de un fotón, se dice que estos complejos son fotoactivos.

Diferentes ligandos tienen distinto carácter electrodonor o electroaceptor. Existen ligandos como por ejemplo las aminas alifáticas, que tienen electrones disponibles en orbitales σ y son "buenos donores σ". Otros ligandos, como la piridina, tienen orbitales π vacantes que pueden ser ocupados por electrones del metal y se los llama "aceptores π". Los ligandos electrodonores tienden a aumentar la densidad electrónica sobre el metal, y los electroaceptores, a disminuírla.

Al aumentar la densidad electrónica sobre el metal se estabiliza su estado redox Ru(III); y al disminuírla se estabiliza el estado Ru(II), lo cual influye en el potencial redox de la cupla Ru(II)/Ru(III). Esto se puede expresar formalmente para el caso modelo como $[Ru^{II}(bpy)_3]^{+2}$ --hν-> $[Ru^{III}(bpy^{-})(bpy)_2]^{*+2}$ una vez que la carga se ha localizado. [10]

Por otro lado, existe una correlación entre este estado redox y la posición de las bandas de transferencia de carga ^{1}MLCT y ^{3}MLCT. Desde este triplete puede poblarse térmicamente un estado *d-d* disociativo. [11] Esta última transición será más probable, y la fotólisis más eficiente, si la diferencia de energías entre los estados involucrados (^{3}*MLCT* y *d-d, ΔE* en fig. 4) es pequeña.

La tabla 1, tomada del artículo clásico de Pinnick y Durham [11] ilustra, para complejos de la forma $[Ru(bpy)_2(X)(Y)]^{n+}$, la correlación entre la naturaleza de los

ligandos, su carácter electrodonor, la posición de la banda MLCT y la eficiencia cuántica de fotoliberación.

Ligando X	**Ligando Y**	**E ½**	$\lambda_{máx}$	$\varphi_{fotolisis}$
piridina	Cl	0.79	505	0.04
4-acetilpiridina	Cl	0.82	495	0.07
CH_3CN	Cl	0.86	481	0.12
piridina	piridina	1.3	454	0.2
4-acetilpiridina	4-acetilpiridina	1.45	442	0.29
3-iodopiridina	3-iodopiridina	1.36	442	0.24
CH_3CN	CH_3CN	1.44	426	0.31
imidazol	imidazol	1.02	488	0.001
N-metilimidazol	N-metilimidazol	0.94	483	0.001

Tabla 1. Posiciones de la banda MLCT, potenciales redox y rendimientos cuánticos de fotólisis para los compuestos $[Ru(bpy)_2(X)(Y)]^{n+}$.[11]

Resumiendo, la eficiencia cuántica de fotoliberación y la posición del máximo de absorbancia en el visible están correlacionados, y ambos modulados por la capacidad del conjunto de ligandos de modificar la densidad electrónica sobre el metal y de reorganizar la estructura de orbitales moleculares.

Varias aplicaciones interesantes se derivan de la naturaleza de este sistema. En el Laboratorio de Dispositivos Moleculares tratamos en particular con compuestos enjaulados.

Compuestos enjaulados

El hecho de que exista una vía de relajación que resulta en fotoproductos (recordar figura 4) permite usar al sistema como grupo protector fotoactivable. Si sintetizamos un compuesto de coordinación que incluya una molécula pequeña con actividad biológica, la interacción de ésta con el sistema biológico estará estéricamente impedida hasta que el grupo protector sea fotorremovido. Esta idea da

origen a la tecnología de "compuestos enjaulados" o caged compounds y es la línea principal de investigación en nuestro laboratorio.

Debemos mencionar que los compuestos enjaulados clásicos utilizan grupos protectores orgánicos, como nitrobencilo y dimetoxinitrobencilo. Hasta el cambio de siglo su aplicación más común era la fotoliberación de Ca^{+2} en sistemas biológicos,[12] con tiempos no mejores que el milisegundo y requiriendo (comparativamente) mucha luz ultravioleta para su fotoactivación, la cual compromete al sistema biológico en estudio. Desde el año 2003 nuestro grupo [13] y otros [14, 15] hemos abierto el abanico de biomoléculas enjauladas disponibles, disminuyendo la cantidad de luz necesaria para liberarlos, y acortado los tiempos de las fotorreacciones involucradas, lo cual permite utilizarlos para atacar preguntas biológicas más precisas. Nuestros desarrollos se caracterizan en particular por no requerir luz UV sino visible, lo cual tiene varias ventajas, como se mostrará en este trabajo.

En nuestro caso los grupos protectores son complejos de Ru-bpy, es decir, de base inorgánica. Las moléculas pequeñas enjauladas son neurotransmisores y otras moléculas neuroactivas (glutamato, GABA, glicina, serotonina, nicotina, etc) que coordinan al Ru por nitrógenos piridínicos o aminas primarias. Dado que la basicidad de los ligandos modula el comportamiento fotoquímico de los complejos, y dado que un máximo de absorbancia desplazado hacia el azul suele implicar una alta eficiencia cuántica de liberación, una de las hipótesis principales en este trabajo es que esta tecnología puede extenderse a moléculas que coordinan por azufres poco básicos obteniendo complejos con máximos de absorbancia entre 400-450 nm, y por lo tanto buenas eficiencias cuánticas de fotoliberación.

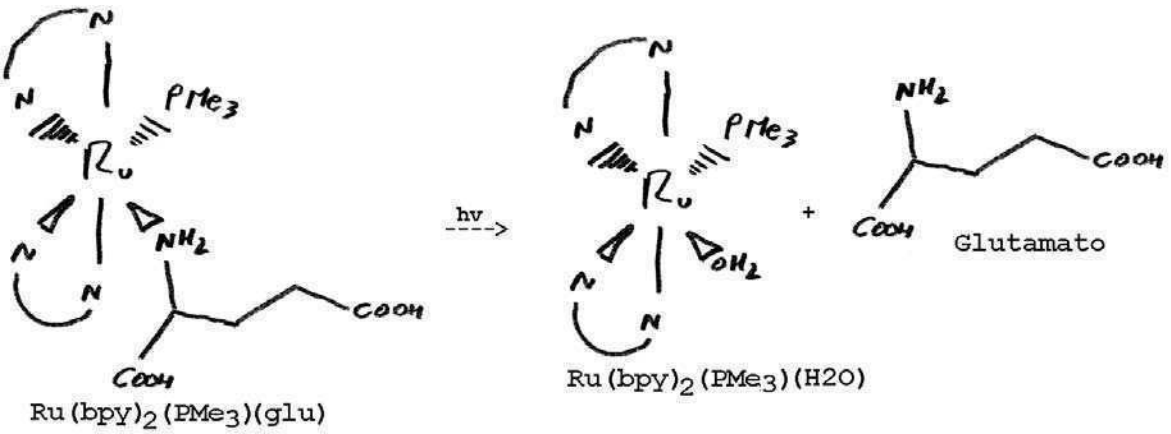


Figura 5: Ru-bpy como grupos protectores. El compuesto $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(Glu)]^{+2}$ es un enjaulado de glutamato. Su fotólisis resulta en glutamato libre y $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(H_2O)]^{+2}$.

En la figura 5 se esquematiza la fotólisis de un complejo de glutamato, RuBiGlu [16] que al ser irradiado libera glutamato (un neurotransmisor) y el grupo protector que no tiene actividad biológica detectable.

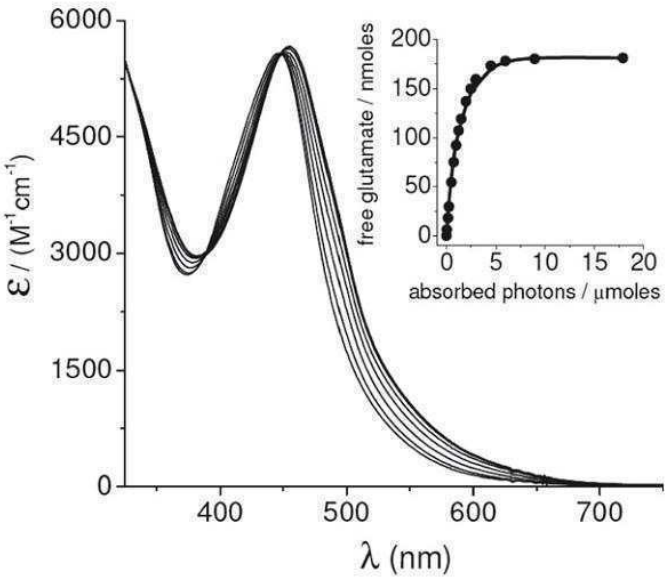


Figura 6: Espectros UV-Vis tomados durante la fotólisis de RuBiGlu. Notar el corrimiento al rojo de cada espectro a medida que avanza la reacción. El inserto muestra la cantidad de glutamato libre vs. la cantidad de fotones absorbidos.

Este intercambio de ligandos (amina por H_2O) cambia la estructura de orbitales moleculares del complejo y altera las transiciones electrónicas disponibles. En estos complejos el H_2O se comporta como mejor dador σ que la amina del glutamato. Al reemplazar glutamato por H_2O la transición MLCT ocurre a energías más bajas y el máximo de absorbancia aparece ahora corrido al rojo. Este efecto se puede usar para

cuantificar, por ejemplo, el avance de una reacción de fotólisis (fig. 6). La cinética de la reacción de fotodisociación es muy rápida (figura 7), con una constante de tiempo τ=~10 ns [3], mucho más rápida que el tiempo característico de los cambios conformacionales de grandes proteínas, como por ejemplo el receptor nicotínico de acetilcolina. [17]

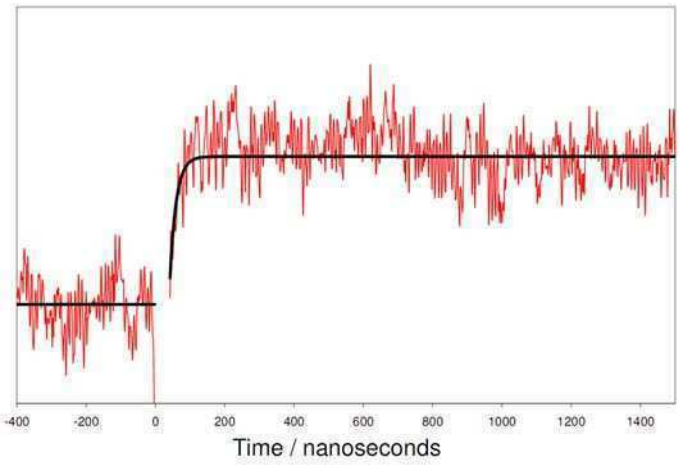


Figura 7: (izq) Esquema de $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(Glu)]^+$. Medición de la cinética de la reacción de fotólisis usando un láser pulsado de 532 nm. τ=12 ns, delay=38 ns, ϕ=0.13. Promedio de 256 eventos.

La figura 8 muestra el efecto de iluminar, con un puntero láser verde, el soma de una neurona Retzius de sanguijuela *Hirudo medicinalis* que tiene receptores de glutamato [18] en solución salina con el fotoliberador de glutamato RuBiGlu.

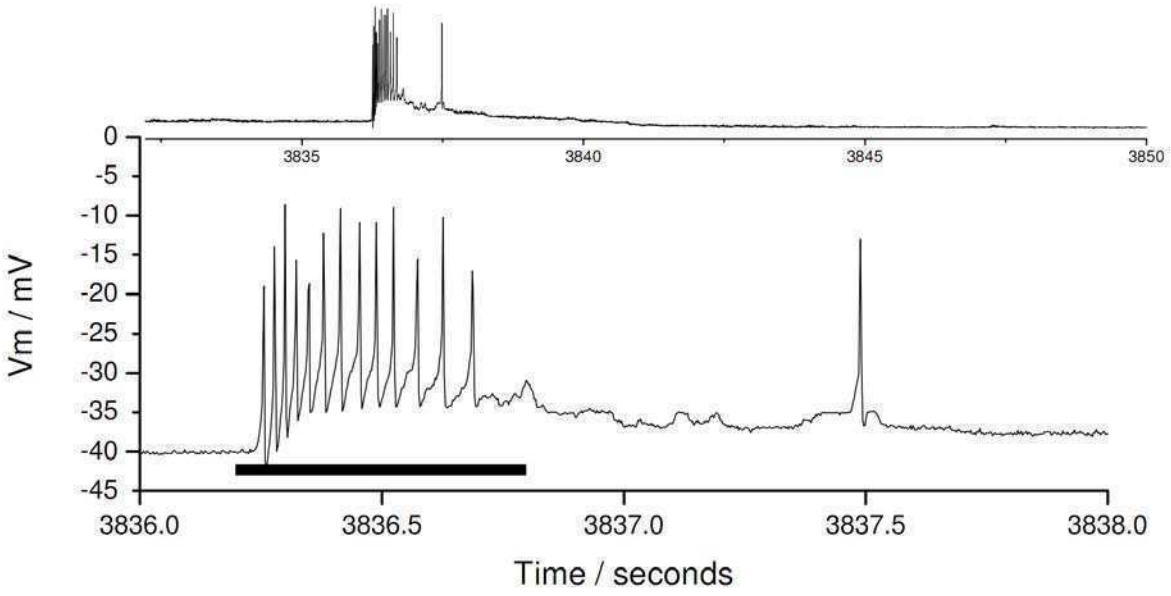


Figura 8: Potencial de membrana vs. tiempo en una neurona Retzius al fotoliberarle glutamato con $[Ru(bpy)_2(PMe_3)Glu]^{+2}$ con un puntero láser verde (532 nm) durante 500 ms. Arriba: lejos de la estimulación, la neurona está en reposo.

Objetivos generales.

Además del campo de las neurociencias que tiende al diseño de metodologías completamente ópticas[19], los compuestos enjaulados son aplicables a otras áreas que comienzan a ser exploradas con estas herramientas. Campos diversos como la biología del desarrollo y de la diferenciación celular, y las técnicas de allí derivadas, como la generación *in vitro* y regeneración *in vivo* de tejidos y órganos, y las técnicas de liberación controlada de fármacos, están desarrollando métodos [20] ópticos para manipular, además de medir, del patrón de expresión de genes de un sistema biológico en estudio.

Nos parece interesante y oportuno explorar las posibilidades que los compuestos enjaulados basados en Ru-bpy pueden aportar en esas áreas, y en particular la posibilidad de desarrollar un método para controlar la expresión de genes con luz visible.

Capítulo 1: Superficies Fotoactivables.

Introducción.

Un complemento perfecto para la tecnología de compuestos enjaulados compatibles con soluciones fisiológicas que fue desarrollada en nuestro laboratorio, es la aplicación de enjaulados a superficies, de modo de poder modificar las propiedades químicas de estas superficies con luz.

Una de las líneas de investigación del Laboratorio de Superficies Funcionales, dirigido por Aránzazu del Campo, en el Instituto Max Planck de Polímeros en Mainz, Alemania, es el de Superficies Biofuncionales Fotoactivables. Justamente, uno de los objetivos de ese grupo de trabajo es obtener una superficie cuyas propiedades químicas sean modulables por luz. Más aún, se desean modular *diferentes características químicas* con *diferentes longitudes de onda*. La estrategia es tapizar las superficies con moléculas unidas a grupos protectores que sean funcionalmente ortogonales entre sí. Dos grupos protectores se dicen ortogonales entre sí en cuanto a la fotoactivación si existen rangos de longitudes de onda que fotoactivan a cada uno de ellos pero no al otro.

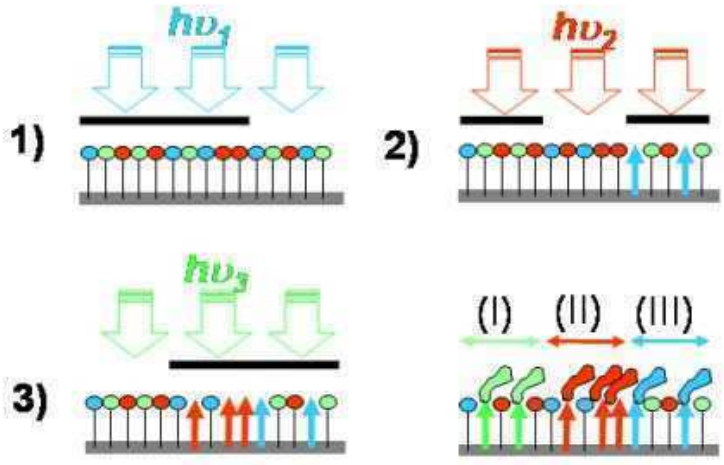


Figura 9: Combinación de distintas máscaras y longitudes de onda para desprotección. El resultado es la exposición de distintas combinaciones de grupos funcionales en distintas zonas.

De este modo, es posible especificar qué grupo protector se va a quitar con sólo cambiar la longitud de onda con que se irradia la superficie. La figura 9 ilustra un método que combina irradiación a través de máscaras y diferentes longitudes de onda para crear un patrón cualesquiera de desprotección de los grupos unidos a la superficie. La utilidad de esta herramienta para la biomedicina radica en la posibilidad de manipular las interacciones célula-substrato, y en la posibilidad de exponer a células creciendo en una superficie a distintos factores (y combinaciones de factores) de crecimiento. El tipo celular en que una célula se diferencia está determinado en gran medida por las moléculas con las que las células tienen contacto en las superficies sobre las que crecen.

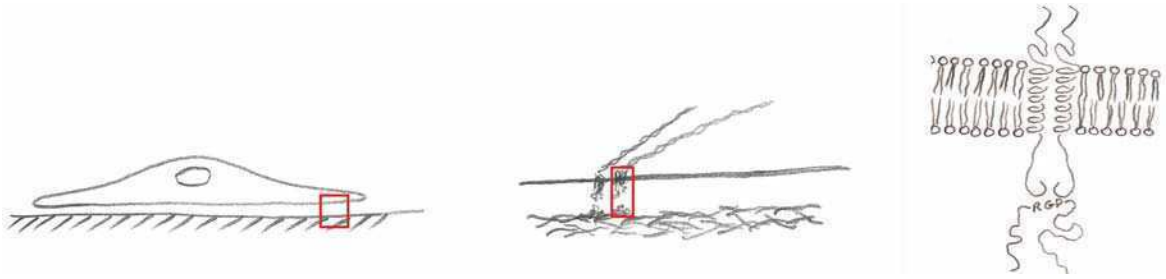


Figura 10: Esquemas de la interacción entre una célula y el sustrato sobre el cual ésta crece. Centro: citoesqueleto unido a proteínas de anclaje, como Integrina-Fibronectina entre la membrana plasmática y el sustrato. Derecha: proteína transmembrana Integrina (cadenas α y β) interactúan en el espacio extracelular con el dominio RGD de la Fibronectina, que forma parte de la matriz extracelular.

Las células (de eucariotas superiores) no crecen sobre un substrato simplemente "apoyadas" en él, sinó que crecen adheridas al substrato a través de diversos mecanismos. Existe un "diálogo" entre las células y las superficies con las que tienen contacto, y pocos tipos de células crecen en suspensión, sin contacto alguno con superficies. Se habla de interacciones *inespecíficas*, como las que resultan en adhesión célula-substrato mejorada mediante la modificación del substrato con grupos aniónicos o catiónicos, e interacciones *específicas* a las que requieren una

proteína en particular presente en el sustrato. Ambos tipos de interacciones son en principio modulables usando grupos protectores. Un ejemplo clásico de interacción específica es la unión entre la proteína de membrana Integrina, y la proteína de la matriz extracelular Fibronectina (fig. 10). La interacción ocurre, más específicamente, entre la Integrina y el motivo RGD (por aRginina, Glicina, áciDo aspártico) de la Fibronectina, y es suficiente con que esta secuencia de tres aminoácidos esté presente en el substrato en cierta conformación y accesible, para hacer una diferencia en el comportamiento celular (en particular, en el comportamiento migratorio, que es uno de los mecanismos requeridos por células tumorales para formar metástasis).

La capacidad de modular la interacción entre una superficie y un tipo celular puede hacer toda la diferencia ante el posible rechazo de una prótesis por parte del sistema inmune del paciente [21] y los estudios sobre materiales biocompatibles tienen, por lo tanto, impacto directo en la tecnología de implantes ortopédicos y neurales, *stents* cardiovasculares, y otros dispositivos de implante crónico. [22]

Grupos protectores orgánicos.

En el grupo de Superficies Bioactivas se atacó este problema usando la tecnología de compuestos enjaulados tradicional: grupos protectores orgánicos, fotorremovibles con luz ultravioleta (UV). Se muestra una selección de ellos en la figura 11, y sus espectros de absorbancia en la figura 12.

Esta tecnología es usada, por ejemplo, para estudiar el grado en que la adhesión de células al sustrato es un estímulo mecánico en la diferenciación y proliferación celular [5][23], y en la migración celular.

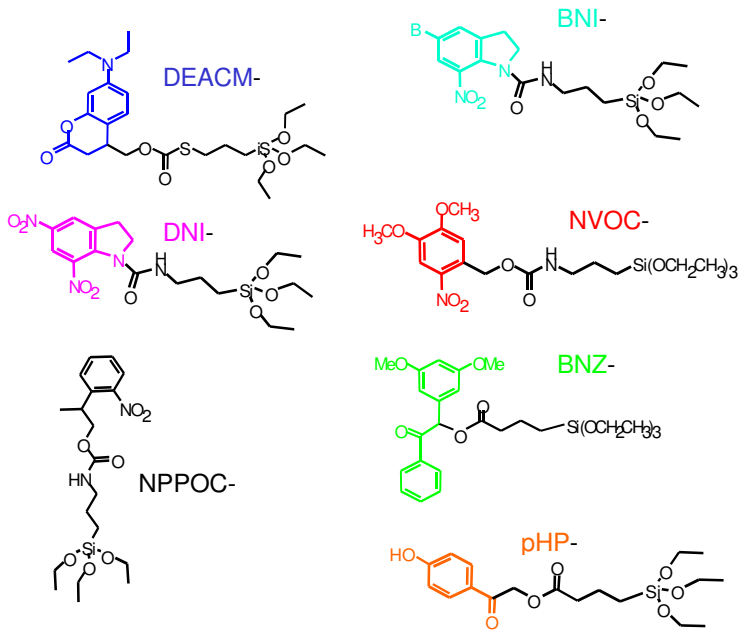


Figura 11: Algunos grupos protectores orgánicos.Todos los grupos se muestran protegiendo un aminopropiltrietoxisilano, el cual es usado para unir covalentemente una amina o un carboxilato a un sustrato de vidrio ó cuarzo.

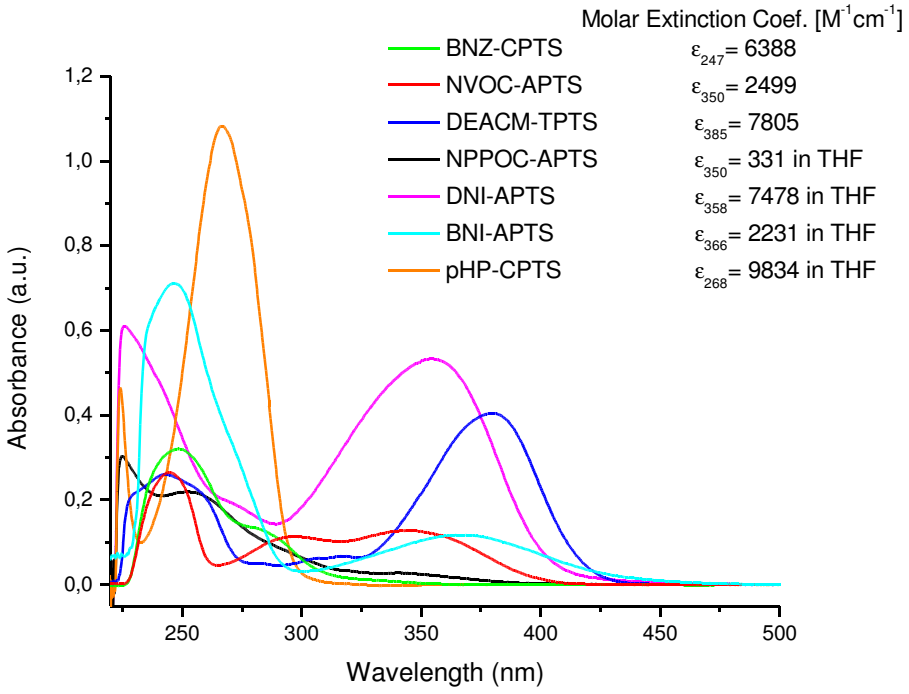


Figura 12: Espectros de absorbancia de los grupos protectores orgánicos. Pocos tienen alta extinción molar en el rango visible (> 400 nm) y/o son poco solubles en solución fisiológica.

En cuanto al uso de superficies microfuncionalizadas, el grupo de Superficies Funcionales había ensayado dos estrategias principales:

[1] Tapizar la superficie de cultivo celular con moléculas que influyen la adherencia célula-substrato dispuestas en diferentes patrones, y estudiar las geometrías que las células adoptan al crecer sobre él.

[2] Modificar la superficie mientras existe una interacción célula-substrato, y estudiar las consecuencias en las células que interactúan con la superficie.

La primera estrategia puede implementarse tapizando una superficie con grupos (adherentes o no-adherentes) protegidos por grupos fotorremovibles. y luego irradiando a la longitud de onda adecuada, a través de una máscara, para exponer un patrón particular de moléculas. Esta es la estrategia ilustrada en la figura 13, que resulta en un substrato de cultivo microdecorado con moléculas de adhesión

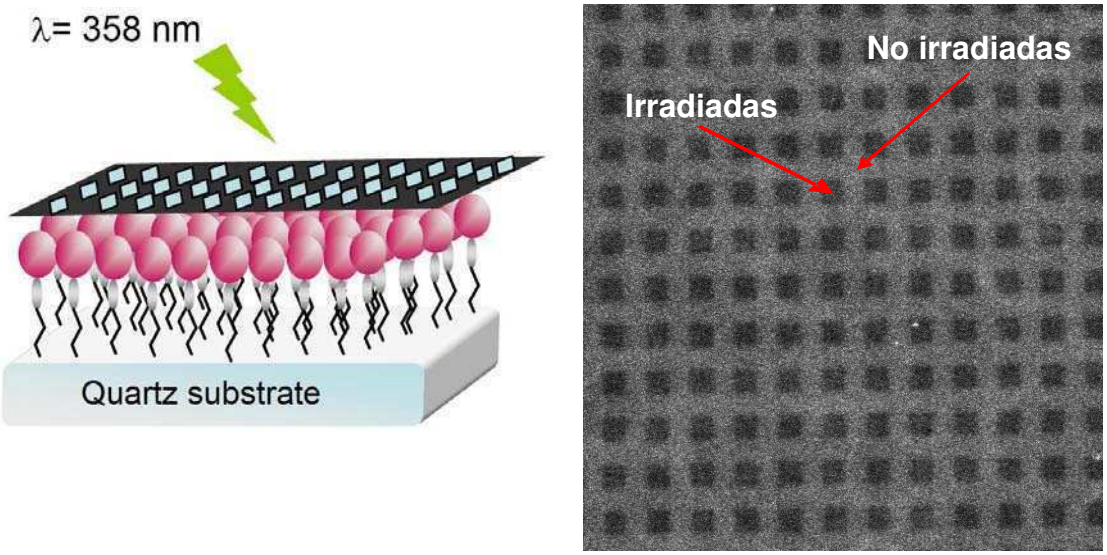


Figura 13: (Izquierda) Ilustración de una superficie de cuarzo cubierta por grupos amino protegidos con BNI, irradiada a 358 nm, cubierta con AlexaFluor y (Derecha) observadas al microscopio de fluorescencia.

Esta última estrategia, combinada con grupos protectores orgánicos, requiere superficies de cuarzo, transparentes a la luz UV y óptica en el microscopio compatible

con radiación UV, además de la fuente de luz UV de longitud de onda acotada. Una salvedad a este requisito es irradiar en régimen de excitación con dos fotones (2PE), aunque requiere una fuente de luz IR de alta intensidad, la sección eficaz de captura de 2PE es generalmente baja para los compuestos enjaulados de base orgánica.

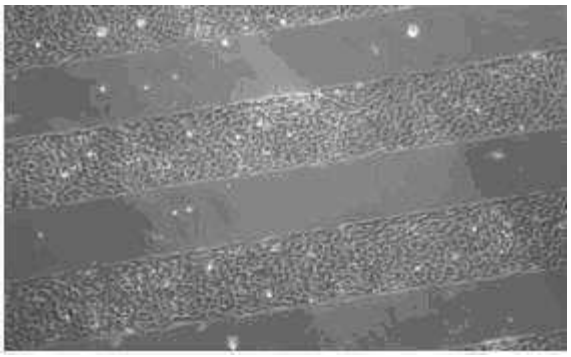


Figura 14: Células HUVEC crecidas durante 24 horas sobre poliestireno tapizado con grupos RGD protegidos e irradiado a 365 nm en un patrón de bandas de 100μm de ancho. Estas células normalmente no crecen en poliestireno.

Estos resultados son en sí mismos muy interesantes, porque permitirían, por ejemplo, crecer dos tipos celulares con patrones de cultivo predefinidos, y estudiar la interacción entre ambas células. Se han diseñado sistemas mecánicos de microcultivo que permiten hacer esto. [24] Sin embargo, si quisiéramos estudiar sistemas más complejos, que involucren más de dos o tres moléculas de adhesión, volvemos a necesitar ortogonalidad en los grupos protectores usados.

Dicha ortogonalidad puede alcanzarse por diferentes métodos: Si evitamos el solapamiento de sus espectros de absorbancia, uno de los grupos protectores no será fotoactivado a la longitud de onda que más eficientemente fotoactiva al otro. Aunque este método es en teoría el más simple de implementar, la no-superposición de espectros de absorbancia para más de dos grupos protectores es difícil de lograr, porque los cromóforos suelen presentar "colas" de absorbancia a longitudes de onda

cortas. Esto se agrava en el rango visible por la escasez de grupos protectores sensibles a luz de $\lambda > 400$ nm.

Otro método es usar grupos protectores cuyas eficiencias cuánticas difieran marcadamente entre sí. En este caso, podemos irradiar a una longitud de onda con baja intensidad, aceptando liberar una concentración muy baja de un grupo secundario, si con ello liberamos una concentración significativa del primero. En un trabajo reciente [25] se identifican grupos de cromóforos que pueden utilizarse de este modo.

Grupos protectores inorgánicos.

La tecnología de complejos de rutenio es especialmente útil para la aplicación a superficies con jaulas ortogonales por tres razones principales:

En primer lugar, el Grupo de Superficies Bioactivas ya estaba desarrollando este concepto utilizando una batería de grupos protectores orgánicos (figura 11) todos fotolizables con luz de longitud de onda menor a 400 nm , por lo tanto la posibilidad de irradiar y fotolizar con luz visible extiende en ~150 nm el rango fotoactivo.

En segundo lugar, dado que es posible modular la posición del máximo de absorbancia de los complejos de Rutenio cambiando sus ligandos, resultaba atractiva la posibilidad de tener más de un grupo protector fotolizable con luz visible.

Y en tercer lugar, las eficiencias cuánticas de fotoliberación de los grupos Ru-bpy son altas (típicamente entre 0.10 y 0.40), lo cual habilitaría, en caso de existir una débil superposición de bandas, a usarlos como un grupo "eficiente" junto con otro grupo "poco eficiente". Por otra parte, los compuestos de Ru-bpy han demostrado poseer secciones eficaces moderadamente altas en régimen de excitación con 2

fotones (2PE), del orden de 0.1-1 GM [26], lo cual los hace especialmente útiles para trabajar en preparaciones de gran espesor (milímetros), dada la mejor penetración de longitudes de onda largas en tejido vivo. [27]

El objetivo de una visita de tres meses al Instituto Max Planck de Polímeros en Mainz por parte del tesista, fue desarrollar las técnicas de modificación de superficies con grupos protegidos por Ru-bpy, y diseñar y poner en marcha un instrumento óptico para fotolizar, a escala subcelular, los grupos protectores en dichas superficies.

Como demostración de concepto (*proof of principle*) de la modificación química de superficies con moléculas protegidas por Ru-bpy, se funcionalizó una superficie de cuarzo con aminopropiltrietoxisilano coordinado a rutenio por el nitrógeno, usando Cl^- en la sexta posición. La superficie resultante, tapizada en aminas protegidas con $[Ru(bpy)_2Cl(L)]^+$ fue irradiada con un patrón en particular. Luego se la hizo reaccionar con un grupo fluorescente (Cy5), que une grupos amino libres. Finalmente se reveló la distribución de Cy5 usando un microscopio de fluorescencia, rescatando el patrón de irradiación original.

Este trabajo demostró que los grupos protectores basados en Ru-bpy son perfectamente aplicables a la tecnología de superficies fotoactivables, con grandes ventajas respecto a los grupos protectores orgánicos respecto a facilidad de implementación, fotoactividad, y costo de la óptica involucrada.

Materiales y Métodos

Construcción de un setup para microfotolitografía.

Con el objetivo de tener una herramienta que nos permitiera irradiar superficies con patrones microscópicos, se configuró un setup con láseres, un mecanismo de guiado del haz, y una cámara para fluorescencia, y se programó *software* de control del siguiente modo:

En una mesa para banco óptico de 1200 mm x 750 mm (Thorlabs, PBH51512) se montó un microscopio invertido (Leica DM-IRM) de forma solidaria a la mesa, sobre pilares cónicos, de modo que pueda ser retirado verticalmente para reparaciones ó limpieza y volverse a montar sin perder la alineación con el resto del sistema. Se montaron tres láseres (Z-LASER Optoelektronik GmbH, modelos de la línea 18M) de 532 nm, 450 nm, 405 nm, azul y violeta con intensidad modulable y 1 mW de potencia nominal, además de un láser rojo (670 nm < 0.5 mW) a usar como indicador de posición sin fotolizar la muestra.

Para poder ajustar la alineación y corregir diferencias en traslación y/o dirección para cada uno de ellos por separado, cada láser es reflejado en dos espejos (Thorlabs, PF10-03-F01) antes de incidir en el espejo dicroico (Thorlabs, serie DMLP) que hace coincidir su trayectoria con las de los demás. Se usó un espejo más y un periscopio antes de entrar al sistema de guiado, montado frente al "camera port" (C-Port) del microscopio. Este está ubicado inmediatamente por debajo del tambor de objetivos, de modo que se minimizó la cantidad de elementos ópticos del microscopio que interfieren en el paso del haz. Para alinear cada láser se usaron dos *pinholes* (dos puntos que definen una línea en el espacio) y paciencia.

El sistema de guiado se basó en un par de espejos orientados por motores servo con control de posición por retroalimentación (Thorlabs, GVS002). Para cada espejo,

la posición "deseada" queda definida al aplicar un voltaje a la entrada de la lógica de control: ±10 V equivalen a ±10 ° de giro en los espejos. Las controladoras, que a su vez alimentan a los motores, comparten una fuente de alimentación estabilizada (Thorlabs, GPS011).

La generación de dichos voltajes de control y demás requerimientos de entrada y salida de datos para todo el setup, resultaron centralizados en una tarjeta de interfase digital (BMC-Messsysteme, PCI-eBASE) a la que le fue agregado un módulo de conversión digital-analógico de 8 canales, 16 bits (MDA16-8i) y un segundo módulo de conversión analógico-digital de 8 canales, 16 bits (MAD-16f), ambos en formato *piggyback*. El resultado de esta configuración fue una interfase de 32 bits de entrada ó salida digitales más 8 canales de entrada y 8 de salida analógicos. Dos de estas señales analógicas de salida se usaron para controlar la posición de los espejos; otras dos señales se usaron para controlar la intensidad de los láseres de 405 y de 450 nm. El resto de las señales se reservaron para controlar otros dispositivos en el futuro. La tarjeta de control actúa y recibe información a través de *relays* y optoacopladores (OR8) que aíslan a la PC de posibles problemas eléctricos en el setup a la vez que suministran la potencia necesaria desde una fuente de PC tipo ATX dedicada al setup.

Como sistema de seguridad para el operador, se instaló un shutter de funcionamiento normalmente cerrado (su estado sin alimentación es cerrado). Para abrir este shutter se requiere tanto alimentación como una señal lógica de control. Esta señal de control pasa por un interruptor de tipo microswitch que fue instalado dentro del microscopio, que sólo se cierra cuando el paso de luz hacia los oculares está completamente bloqueado. De este modo sólo entra luz láser al microscopio si los oculares están mecánicamente bloqueados, aun cuando todas las señales lógicas

requeridas estén habilitadas. Esto evita irradiar los ojos del operador debido a descuidos e incluso a desconexiones accidentales del circuito.

Con la excepción de esta llave manual de seguridad, todo el setup (incluso su encendido) resultan controlados por *software* especialmente programado para tal fin. El setup quedó confinado dentro de paredes y techo opacos (del estilo XE25C5/M). lo que ayuda a evitar accidentes y mantener limpio e intacto su interior.

Como interfase al usuario se programó en Delphi (Embarcadero) un programa simple con botones virtuales en una ventana bajo Windows el cual tiene dos modos de operación:

[1] Un "modo manual": Permite controlar manualmente toda la electrónica, permite encender el equipo y cada láser, habilitar la línea "light output", abrir el shutter principal y situar el haz de láser sobre la superficie a irradiar orientando los espejos galvanométricos. El programa permite irradiar la superficie "a mano" siguiendo con los láseres seleccionados los movimientos del *mouse* sobre la pantalla en tiempo real.

[2] Un "modo automático": El programa lee un "mapa" de intensidades, en formato Bitmap (.bmp) de 256 pixeles · 192 pixeles · 8 bits por pixel, e irradia la superficie según ese mapa. De este modo, es posible leer una imagen prediseñada cualesquiera y dejar al setup irradiando una superficie según esa imagen, sin necesidad de presenciar el proceso (cuyo tiempo máximo es en teoría 256 pixeles · 192 pixeles · 256 ms · $pixel^{-2}$ = 210 minutos, aunque rara vez se supera el 10% de este tiempo). En este modo se maximiza la reproducibilidad para las distintas réplicas. El programa de irradiación puede interpretar estos valores para cada pixel tanto como intensidad del láser o como tiempos de exposición a una intensidad de láser fija, a elección. En el caso de interpretarlos como tiempos, puede escogerse entre una escala

lineal que traduce los 256 valores posibles a tiempos entre 0 y 255 ms · pixel^{-1}, o una escala logarítmica, entre 0 y 5000 ms · pixel^{-1}, alcanzando tiempos de exposición largos sin perder resolución a tiempos cortos.

Síntesis de $[Ru(bpy)_2(APTS)Cl]^+$

Se disuelven 5 mg de $[Ru(bpy)_2Cl_2]$ (MW=520, 10 μmoles) en 5 ml de etanol absoluto. Se agregan 180 μL de H_2O (2 equivalentes) y se calienta a 80 °C hasta obtener $[Ru(bpy)_2Cl(OH_2)]^+$. La reacción se sigue con un espectrofotómetro, y buscamos un máximo de absorbancia en 480 nm. Una vez formado el acuocomplejo, se agregan 3 equivalentes de APTS y se mantiene la reacción en oscuridad. La reacción se considera completa cuando el espectro UV-Vis no cambia al llevar la muestra a pH básico (> 10).

Para separar los productos de reacción, la solución se enfría a 0 °C en agua helada y se precipita agregando $NaPF_6$ en exceso, lentamente y con agitación. El precipitado se puede filtrar en vidrio fritado, pero al trabajar con pequeñas cantidades (poca masa), es preferible colocar un papel de filtro sobre el vidrio fritado, lo que permite retirar el papel y secar el producto en la línea de vacío, separándolo después en un solvente como acetona. Otro método, con el que se minimizó la pérdida de masa, fue centrifugar el precipitado en una microcentrífuga de tubos eppendorf de 1.5 ml, durante 2 minutos a 15000 x g, resuspendiendo en agua helada para lavar el precipitado. El exceso de agua se retira eficientemente con una micropipeta, y el tubo eppendorf se puede secar en la línea de vacío (a 1 μbar) en pocas horas en oscuridad para hacer un RMN y verificar el resultado de la síntesis. ^{1}H NMR (MeOD):1Hδ 0.32 (t, 2H),1.15 (t, 9H), 1.45 (m, 2H), 1.88 (t, 2H), 3.71 (q, 6H), 7.15 (m,2H), 7.46 (d, 1H), 7.79 (dd, 6H)., 8.14 (dt,2H), 8.44 (t,2H), 8.60 (t,2H), 9.16 (d, 1H), 9.93 (d,1H).

Funcionalización de superficies.

Pre-tratamiento de las superficies: Se corta un portaobjetos de cuarzo (Suprasyl) en trozos de 1 x 2 cm, dado que éste es el menor tamaño que se puede montar en el espectrofotómetro Cary (Varian). Se dejan 12 horas en solución piraña (mezcla de ácido sulfúrico y agua oxigenada) para limpiar la superficie y exponer grupos hidroxilo. Se enjuagan en agua mQ y se secan en un flujo de N_2 limpio y seco.

Con grupos protectores inorgánicos

En un pequeño recipiente de fondo chato, ancho y con cierre hermético, se arma un "sándwich" de cuarzo y solución de $[Ru(bpy)_2(APTS)Cl]^+$ en THF, de varias capas. Usando trozos de cubreobjetos roto como espaciadores, se dispone: Un cubreobjetos, separadores, (un trozo de cuarzo, separadores)$_n$ un cubreobjetos. Entre los cubreobjetos se pueden apilar tantos trozos de cuarzo (n) como confianza se tenga en la estabilidad de la construcción. Todo esto se separa del recipiente que lo contiene para evitar que el THF moje toda la superficie, con una lámina de algún polímero no soluble (y no mojable) en THF, como Teflon$^{(tm)}$. Se coloca además un reservorio de THF (un eppendorf de 0.5 ml con 200 ul es adecuado) para mantener la atmósfera saturada en solvente, puesto que éste es muy volátil.

Trabajando con una mínima luz de tungsteno en el extremo opuesto del laboratorio, se inicia la reacción de hidrólisis de los grupos etoxisilano con 1µl, 1M NaOH en agua, y usando una micropipeta se cargan los espacios preparados anteriormente con 50 μl de la solución de $[Ru(bpy)_2(APTS)Cl]^+$ en THF. Se cierra herméticamente el recipiente, y se lo deja en un lugar oscuro overnight. Se retiran las

muestras, se lavan con agua fría, y se secan en un flujo de N_2. Una hora de horneado a ~ 90 °C al vacío mejora la unión de los grupos etoxi que pudieran no haber quedado covalentemente unidos.

Con grupos protectores orgánicos

Se cubre homogéneamente la superficie con un aminoetoxisilano, en el que el amino está unido a un grupo fotorremovible (NVoc). Esa superficie se irradia usando el setup descripto con un *pattern* como el mostrado en la Figura 21 (página 43). Este tratamiento desprotege algunos grupos amino, proporcionalmente a la cantidad de luz recibida. Luego se expone la superficie durante 90 minutos a una solución de biotina N-hydroxysuccinimida ester (biotina-NHS) en DMF (60 mg/ml). El sustrato se lava, se sonica, y se enjuaga en DMF, THF y agua. Finalmente, las biotinas se marcan con streptavidina, por exposición durante 2 horas a una solución en PBS, pH7,4 de streptavidina marcada con Cy5, un cromóforo que fluoresce en rojo. El patrón resultante se revela usando un microscopio de fluorescencia.

Resultados y discusión.

Uso del setup para microfotolitografía.

A continuación se muestran algunas imágenes tomadas durante la construcción del setup para microfotolitografía de superficies, e imágenes que muestran su funcionamiento. Por detalles sobre su diseño consultar "Materiales y Métodos".

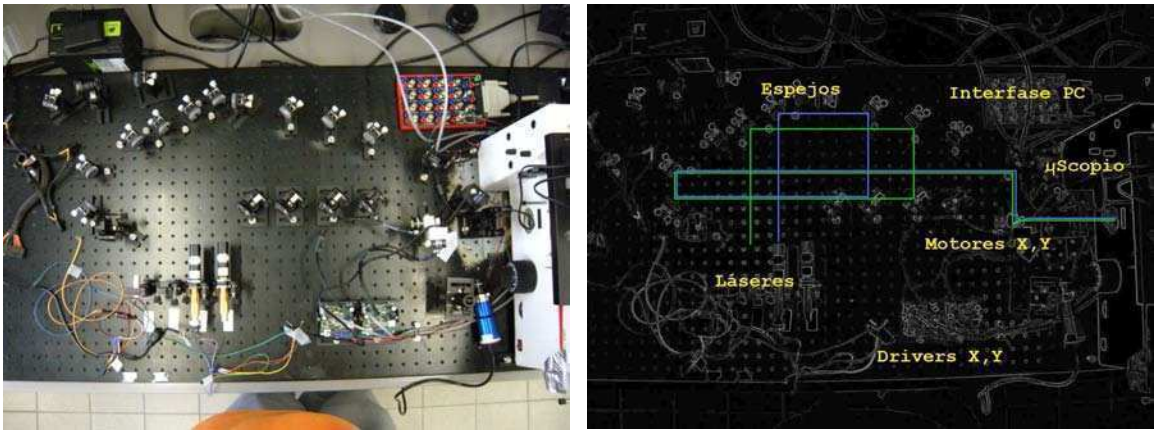


Figura 15: Izq: vista superior del setup en construcción. El banco óptico mide 120 cm x 75 cm. Der: misma imágen, identificando los componentes y trayectoria de 450 nm y 532 nm.

En la figura 15 se aprecia el microscopio montado en el banco óptico de modo solidario. Las trayectorias de 532 nm y 450 nm se muestran completas, con los pares de espejos de alineación, dicroicos, y motores x-y).

Figura 16. Izq: Caja de lasers a punto de ser cerrada. Der: microscopio, PC de control y adquisición y sus dos pantallas, una para el sistema operativo y la otra para la cámara.

En la fig. 16 se aprecia, al centro del setup, la secuencia de *beamsplitters* dicroicos, y a la izquierda el par de espejos principales de alineación, común a todos los láseres y previos a los espejos con motores galvanométricos y la entrada al microscopio por el C-Port. No encontré, en esa mesa, una configuración que me permitiera tener todos los caminos ópticos de la misma longitud, y que además alojara a la electrónica y las paredes de protección. La electrónica de interfase está íntegramente dentro de la caja (arriba, izq y der) o dentro de la PC. La computadora de interfase al usuario incluye una pantalla dedicada a la cámara del microscopio y otra dedicada al sistema operativo.

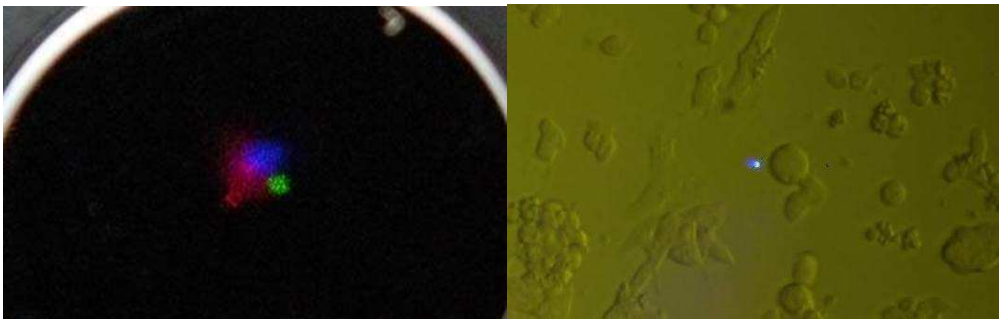


Figura 17: Láseres sobre el último espejo (2.5 cm de diámetro) antes de los espejos de guía X-Y. Notar la "coma" en el rojo, las diferencias en las divergencias (tamaños), y la no-colinearidad. Derecha: Con estos problemas corregidos, el láser de 450 nm (diámetro ~ 2 μm) sobre un cultivo de células BHK.

La figura 17 muestra al sistema MAL alineado. La falta de colinearidad fue corregida iterando mínimos ajustes en los pares de espejos de alineación de cada láser, hasta que siguieran el mismo camino. Las divergencias fueron homogeneizadas ajustando el foco de cada uno. Se muestra el láser de 450 nm en foco sobre un cultivo celular, sin aberraciones.

En la Interfase al usuario del setup, se ven los controles de encendido de la fuente de alimentación general, la apertura del *shutter* principal (que por *hardware* requiere que la salida de luz por los oculares esté bloqueada), el encendido de cada láser, el control lógico de emisión de luz, y la potencia de salida ("Intensity"). El láser de 532 nm no es pulsable (por su tecnología, no es bueno someterlo a ciclos de encendido y apagado repetidos). En lugar de esto se usó un segundo *shutter*. La imágen de círculos concéntricos fue dibujada a mano y guardada como una imágen ".bmp" y será irradiada sobre la superficie, pixel por pixel. En la barra de estado se muestra ("32 ms") el tiempo de residencia del láser en el pixel indicado por el mouse (no visible), el cual está definido por su color. El menú permite elegir entre un modo lineal de especificación de tiempos (entre 1 y 255 ms) y un modo logarítmico (fig. 19). Para poder especificar tiempos largos de irradiación sin perder resolución a tiempos cortos, se implementó un modo logarítmico de conversión de colores a tiempos (valores de color de 1 a 255 corresponden a tiempos de irradiación entre <1 ms y 5 segundos por pixel). Por último, existe un modo manual de guiado del láser ("Manual XY") en el que el láser sigue al mouse en tiempo real.

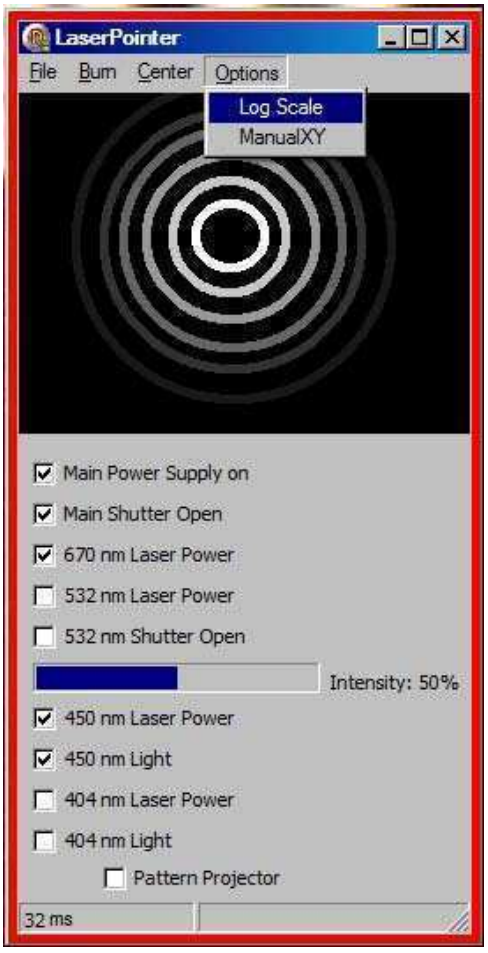


Figura 18: Interfase al usuario del setup de microfotolitografía

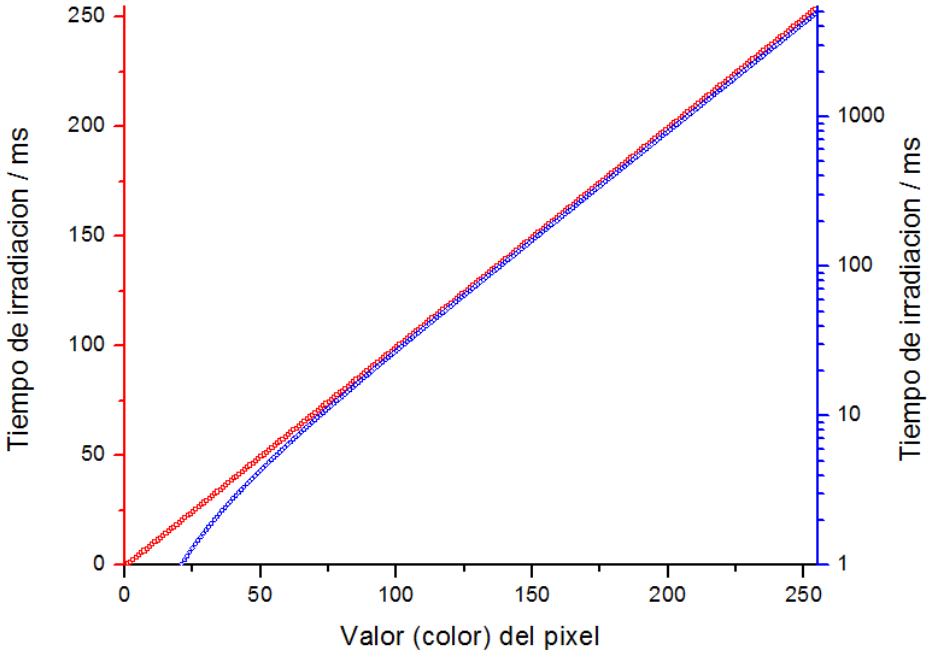


Figura 19: Modos lineal (rojo) y logarítmico (azul) de especificar tiempos de irradiación.

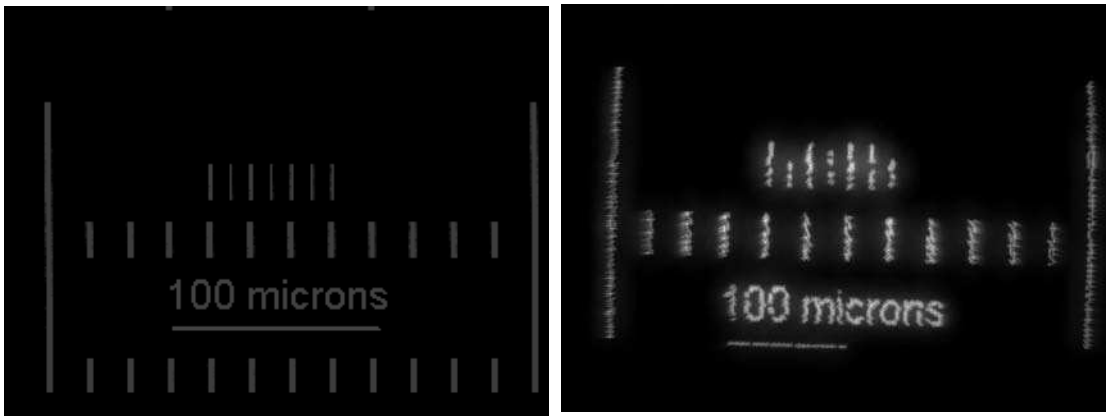


Figura 20: Izq: Imagen en formato BMP de 256 x 192 pixeles. Der: Imágen de una superficie fluorescente que resulta de mantener el obturador abierto durante el proceso de irradiación con el láser de 450 nm. El tiempo de residencia es de 52 ms por pixel. Tiempo total de irrradiación = 2 min.

Como se ve en la fig. 20, el sistema permite proyectar una imágen prediseñada sobre la superficie. La intensidad de las fuentes de luz es constante. Se utiliza una pequeña porción del rango máximo de los espejos. Una deflexión máxima de unos 3.5 grados en X e Y cubre todo el campo visual, de modo que la imágen grabada sobre la superficie apenas si sufre aberraciones geométricas (la superficie no es esférica, sino plana lo cual se traduce en una leve curvatura de las barras verticales).

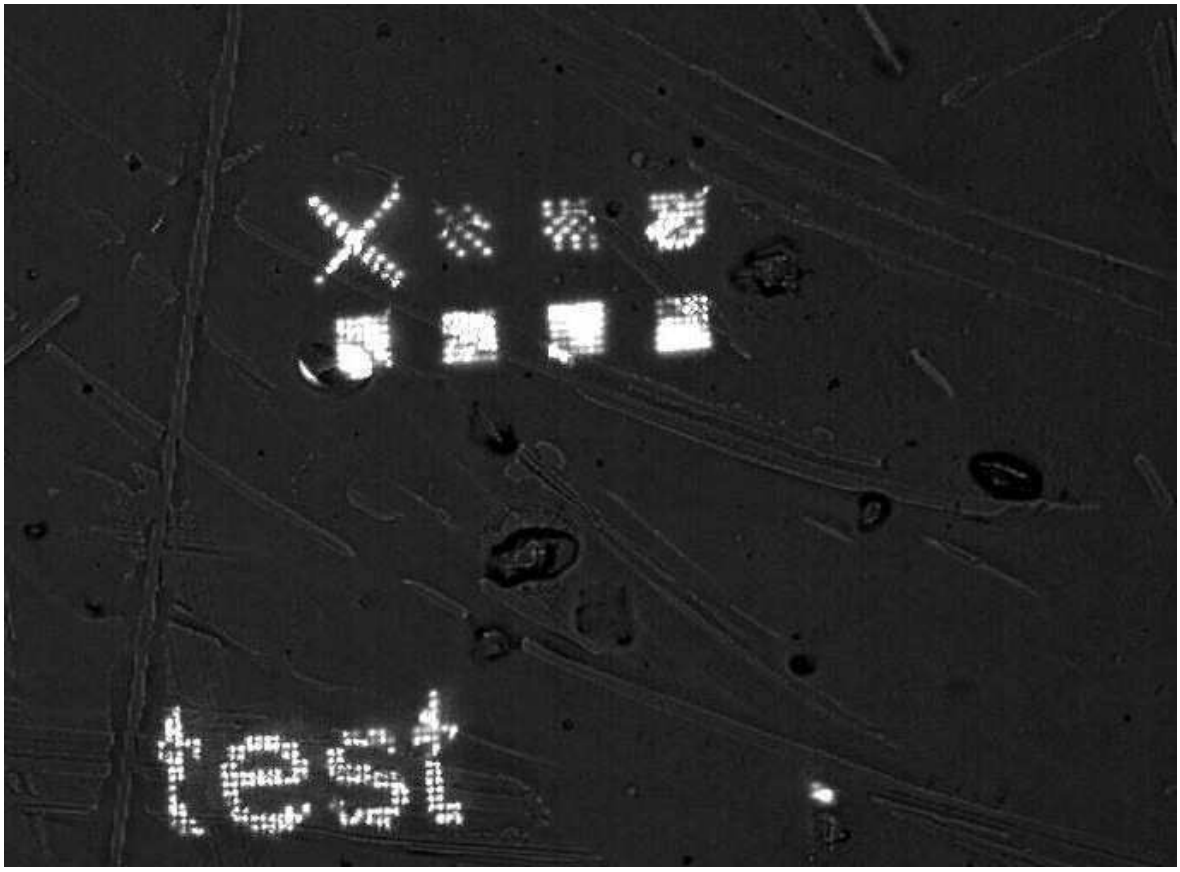


Figura 21: Imágen tomada con la misma técnica que (Fig 15). Los cuadrados miden 20 x 20 µm (del órden del tamaño de una célula de mamífero) . El tiempo de irradiación crece hacia abajo y hacia la derecha. λ_{irr} = 450 nm (laser).

Estos resultados muestran que el equipo efectivamente es capaz de irradiar superficies con una imágen predeterminada de forma automatizada. Es esto suficiente para fotoliberar grupos protectores y modificar la química de la superficie ?

En experimentos posteriores llevados a cabo en ese laboratorio se cuantificó la intensidad de la fluorescencia emitida por la superficie protegida después del tratamiento con distintas dosis de luz, y revelando por la reacción de los grupos amino expuestos con biotina, y ésta unida finalmente a avidina marcada con el fluoróforo Cy5.

El procedimiento que se describe a continuación fue realizado por Marta Álvarez, del mismo laboratorio.

Se cubrieron superficies de cuarzo con un grupo silano, unido a un espaciador (propilo), unido a una amina protegida por un grupo nitroveratrilo fotorremovible (NVOC, en rojo en fig. 11). Las superficies fueron sometidas al mismo patrón de irradiación mostrado en la figura 21. Luego se reveló la reactividad de la superficie incubando primero con biotina N-hidroxisuccinimida, y luego con streptavidina marcada con el fluoróforo Cy5. Por último se tomó una imágen de la superficie por microscopía de fluorescencia (fig. 22, izq.). El análisis de las imágenes muestra que la intensidad de fluorescencia del sustrato sigue fielmente al patrón de irradiación aplicado, indicando que la desprotección química lograda se mantiene durante el proceso posterior de unión a proteínas, en este caso para tiempos de exposición entre 2 ms y 500 ms (fig. 22, der.). Además, la progresión de la reacción completa ajusta bien a una exponencial de la forma $y=a-b^x$, con un coeficiente de correlación R^2 = 0.9992.

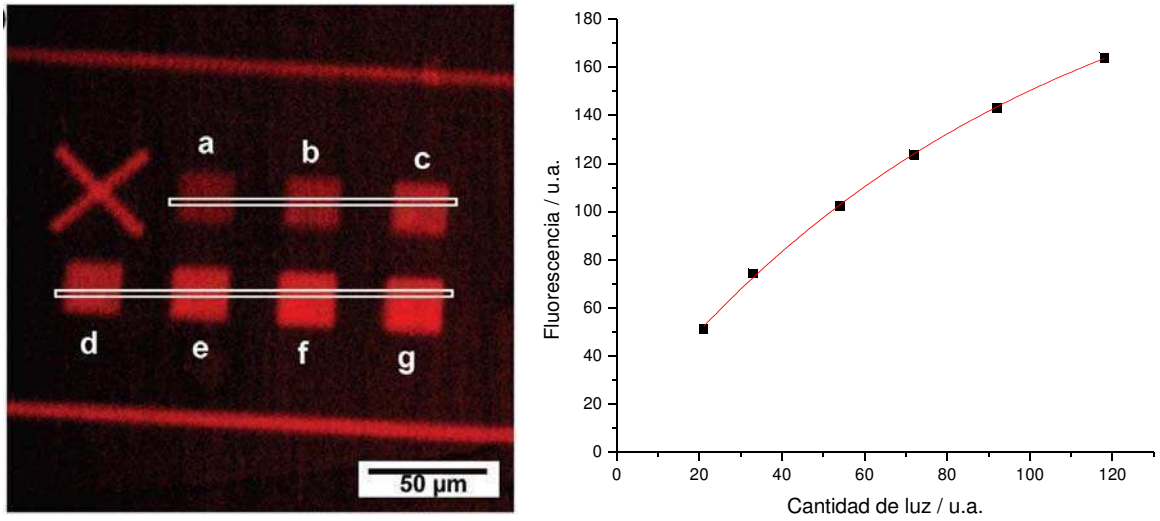


Figura 22. Izq: Distribución del grupo fluorescente Cy5 sobre la superficie de cuarzo. Der: cuantificación de la intensidad de fluorescencia y fiteo de una exponencial. R^2=0.9992. Se excluyó la zona "g" del análisis porque su emisión de fluorescencia satura al detector.

Modificación fotoquímica de superficies.

Dado que el grupo silano + espaciador (aminopropiltrietoxisilano, APTS) que el laboratorio en Alemania utilizaba para tratar las superficies tiene una amina primaria, y dado que en el Laboratorio de Dispositivos Moleculares en Buenos Aires teníamos experiencia en enjaular moléculas por sus grupos amino, elegí esta molécula para intentar conjugar la tecnología de enjaulados en superficie con la de enjaulados con rutenio.

El primer paso entonces fue proteger al APTS con nuestro grupo protector, mediante un enlace de coordinación, para obtener $[Ru(bpy)_2Cl(APTS)]^+$. Esta reacción requiere la acuación del grupo protector como producto intermedio, pues la reacción completa es:

$[Ru(bpy)_2Cl_2] + H_2O, \varnothing \dashrightarrow [Ru(bpy)_2Cl(H_2O)]^+ + APTS, \varnothing \dashrightarrow [Ru(bpy)_2Cl(APTS)]^+$

el cual precipita en agua helada como sal de PF_6^-.

La prescencia de agua en el recipiente de reacción no es deseable, puesto que la reacción de hidrólisis de los grupos etoxi es catalizada por agua. Como se aprecia en el espectro RMN del APTS en su envase original, una porción (3%) ya está hidrolizada (la señales E' en las figuras 24 y 25 corresponden a etanol).

El espectro de UV-Vis del complejo obtenido se muestra en la fig. 23. La forma del espectro y la posición del máximo de absorbancia es la esperada para una Ru-bpy coordinada a cloruro y a un grupo amino. Al irradiarlo, el Cl^- es reemplazado por H_2O y el máximo de absorbancia se desplaza a la izquierda.

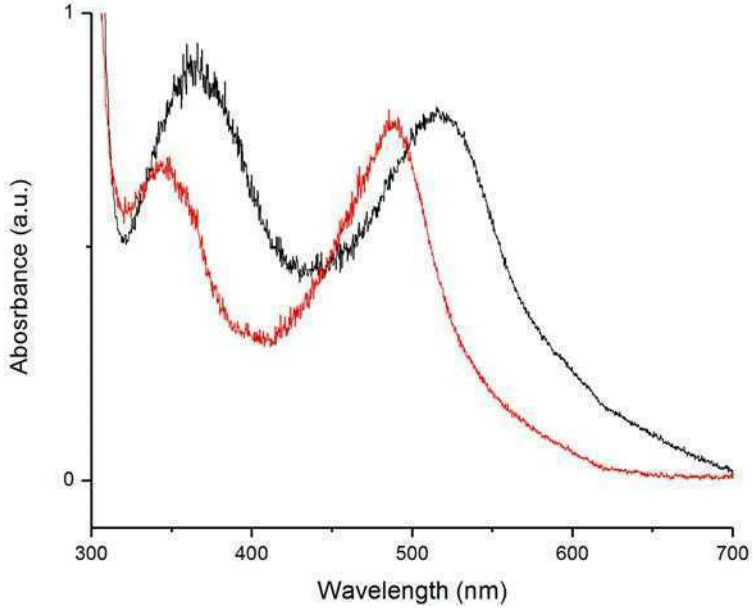


Figura 23: Espectro UV-Visible de $[Ru(bpy)_2Cl(APTS)]^+$ medido en agua (negro) y su producto de fotólisis (rojo).

El espectro RMN (figs 25 y 26) indica que obtuvimos el complejo esperado y que los grupos etoxi no están significativamente hidrolizados (señal E'). La señal de los protones D es la que más cambia su desplazamiento, lo que concuerda con una coordinación por el grupo amino. La presencia de 8 pares de señales de las piridinas indica que se trata de un complejo en configuración *cis* de la forma $[Ru(bpy)_2XY]$.

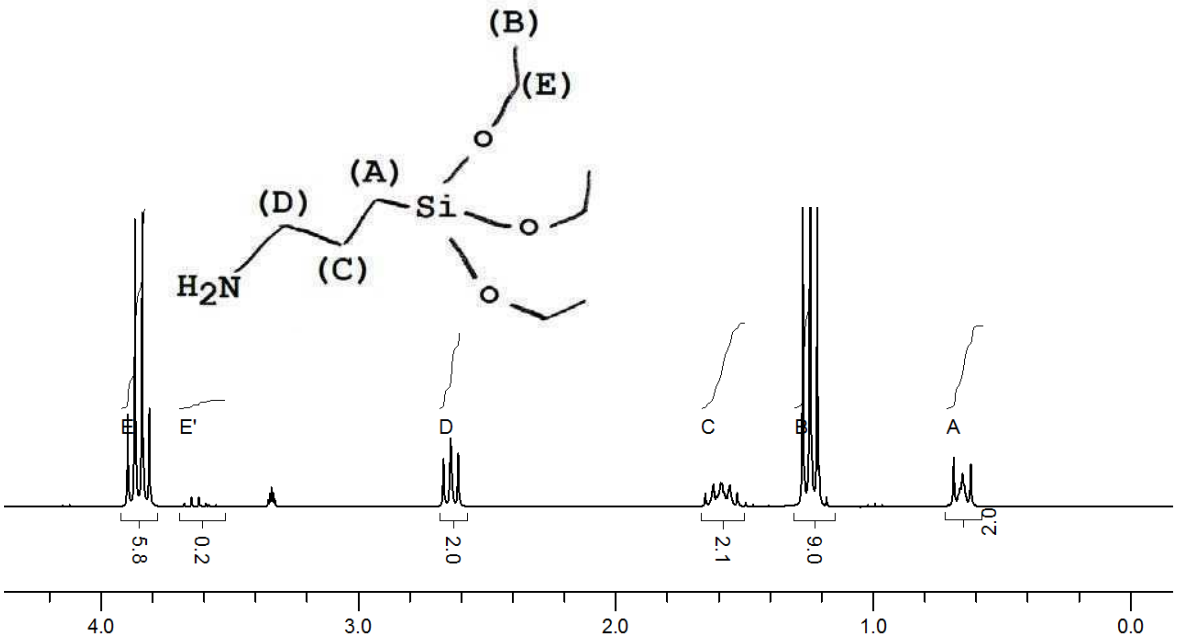


Figura 24: Estructura de APTS con sus protones enumerados. Espectro RMN tomado del APTS en su envase comercial. Se muestra un esquema del APTS con los protones asignados a sus señales. Las señales E (3.8 ppm) y E' (3.6 ppm) corresponden a etoxi y etanol respectivamente.

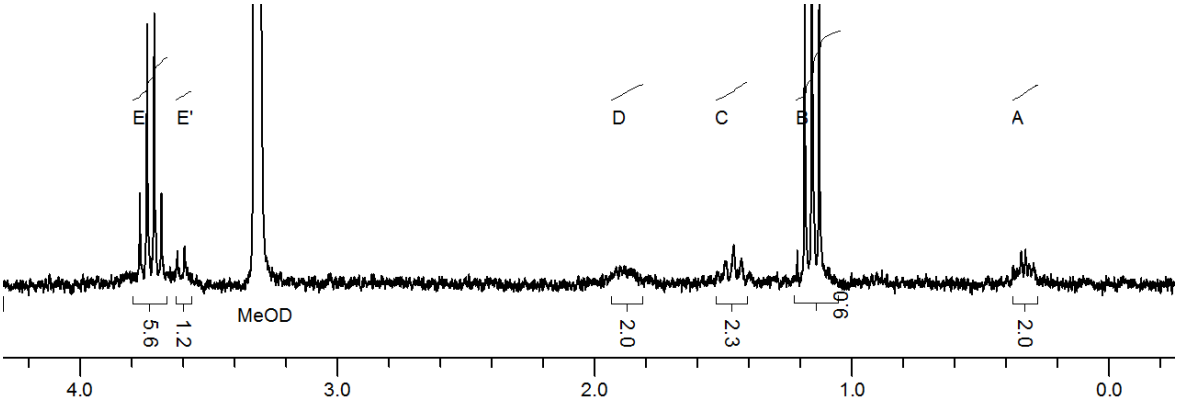


Figura 25: Espectro RMN de $[Ru(bpy)_2Cl(APTS)]^+$ en metanol, zona alifática. Observar desplazamiento de los protones (D) respecto al APTS libre.

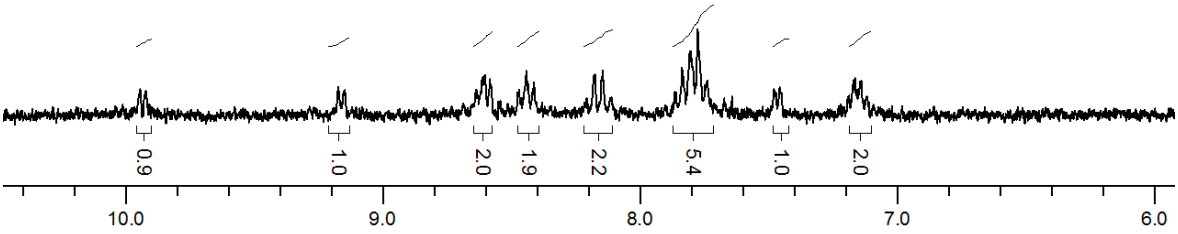


Figura 26:En la zona aromática vemos 16 protones en 8 pares de señales: evidencia de un complejo octahédrico con dos bipiridinas en configuración *cis*.

El paso siguiente es tratar superficies de cuarzo con el complejo obtenido y medir sus propiedades fotoquímicas.

Para el tratamiento de las superficies de cuarzo se usó prácticamente el mismo protocolo que se usa para grupos protectores orgánicos, que fue optimizado para trabajar con mínima cantidad de compuesto (ver Materiales y Métodos). El protocolo consiste en hidrolizar los grupos etoxi en presencia de las superficies a cubrir (portaobjetos de cuarzo fraccionados y limpios); de este modo las superficies resultan tapizadas de ambos lados con una capa de APTS coordinado al complejo de rutenio-bipiridinas. Los sustratos adquieren una coloración rojiza apenas perceptible a simple vista.

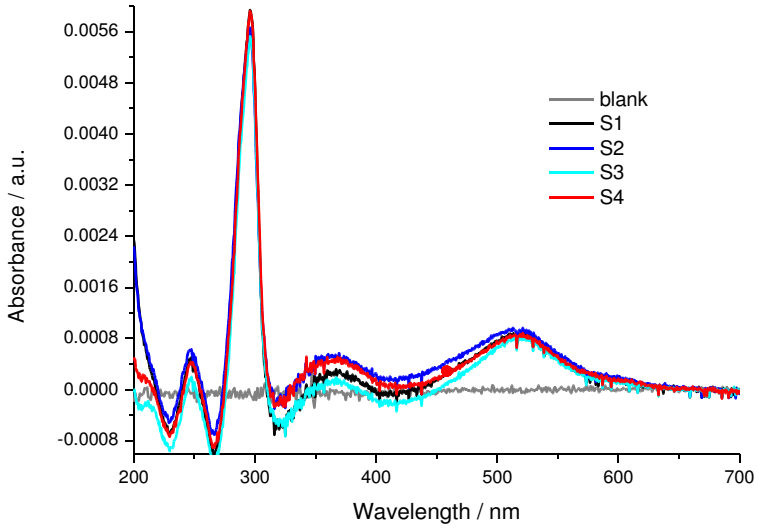


Figura 27: Espectro UV-Vis de los 4 sustratos tapizados con RuAPTS de un mismo *batch*. [Sn refiere a los distintos trozos de cuarzo (sustratos) de un mismo batch]

Los espectros son los esperados. Las variaciones de densidad de cobertura entre diferentes sustratos no son importantes, especialmente en lo que afecta al rango visible.

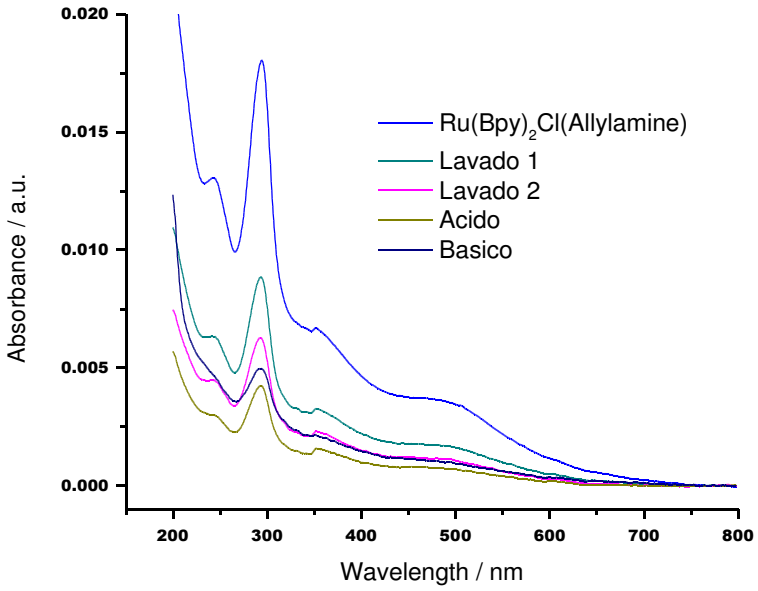


Figura 28: Espectros UV-Vis de superficies tratadas con un complejo de Allylamina (sin el *crosslinker* Silano) .

Para asegurarnos de que los cambios en absorbancia se debían a grupos protectores químicamente unidos a la superficie a través del grupo de anclaje (*crosslinker*) silano, y no, por ejemplo, unido por interacciones electrostáticas, se preparó el complejo $[Ru(bpy)_2Cl(propilamina)]^+$. La propilamina carece de los

trietoxisilanos capaces de unir al propilo covalentemente a la superficie de cuarzo. El espectro UV-Vis de superficies tratadas con este complejo (fig. 28) muestra una dependencia de la intensidad de absorbancia con la inversa de la longitud de onda, típico de un efecto de *scattering*. Aunque "montado" sobre ese espectro vemos el espectro del complejo, ambos disminuyen marcadamente su intensidad si lavamos la superficie con agua pura, o con agua con alta concentración de NaCl, cosa que no sucede con los sustratos con RuAPTS.

Las mediciones fotoquímicas se realizaron en seco y en agua en una cubeta construida *ad-hoc*. La fotólisis de RuAPTS en ausencia de agua tiene una eficiencia cuántica muy baja, sin importar la longitud de onda de la luz de irradiación utilizada (380 nm, 405 nm, 450 nm, 532 nm, o un LED "blanco" de alta potencia). Esto puede ser consecuencia de trabajar en un laboratorio con 22% de humedad relativa ambiente y de haber secado los sustratos en un flujo de N_2 antes de medirlos. Por el contrario, la fotólisis en agua dió los resultados esperados.

Al medir casualmente dos veces consecutivas el mismo sustrato, se obtuvieron dos espectros no idénticos. Con la hipótesis de que la luz de medición del espectrómetro podría ser suficiente para alterar la muestra, se montó un sustrato en el espectrómetro y se tomó una serie de 10 espectros de absorbancia entre 190 nm y 700 nm, uno tras otro sin pausas (cada barrido demora unos 2 minutos). El resultado es la secuencia de espectros mostrada en la figura 29.

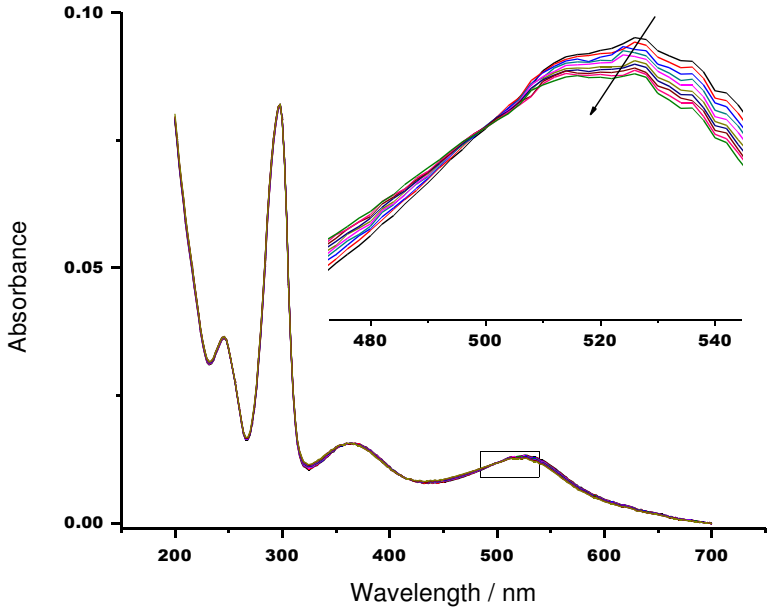


Figura 29: Espectros UV-VIS de la fotólisis en agua de una superficie de cuarzo tratada con $[Ru(bpy)_2Cl(APTS)]^+$. En el inserto (área recuadrada), la flecha indica la progresión de la reacción.

Luego, se repitieron las mismas mediciones sobre otro sustrato, pero intercalando pausas de 10 minutos entre barridos. El resultado fue un desplazamiento del máximo de absorbancia de una magnitud similar. Por otro lado, si se adquirimos menos puntos por espectro e incluímos pausas, mantenemos el intervalo entre barridos pero el grado de fotólisis es menor. Esto verifica que la magnitud del cambio en el espectro está relacionada con el número de veces que el sustrato es medido, y no con el tiempo que tarda el proceso de medición. Esto significa que el cambio en el espectro registrado barrido tras barrido se debe a la incidencia de la luz usada para medir la muestra y no, por ejemplo, a interacción con la atmósfera, o irradiación por luz ambiente.

En estos espectros existen al menos tres puntos isosbésticos que se hacen evidentes en la figura 29, en 360 nm, 410 nm y 500 nm, lo cual indica la presencia de sólo dos especies fotoactivas.

El grado de cobertura medido, calculado con los datos de la fig. 29 como $\Gamma = \frac{1}{2}(Abs_\lambda \cdot N_A \cdot \varepsilon_\lambda^{-1})$ [25] está dentro del orden de magnitud de la máxima cobertura calculada según criterios geométricos ($\sim 10^{14}$ moléculas $\cdot$ cm^{-2}).

Una extensión interesante de esta técnica es la de volver a proteger los grupos amino libres una vez que han sido fotodesprotegidos, ya sea con el mismo grupo protector o con otro, induciendo la reacción de coordinación sobre la misma superficie. Con esto en mente, el último experimento en esta línea fue intentar la vía sintética alternativa: tapizar primero las superficies con APTS y luego coordinar los grupos amino libres con $[Ru(bpy)Cl(H_2O)]^+$. Se obtuvieron superficies "sucias" con complejo de rutenio, lavables con agua, con un comportamiento similar al obtenido con los complejos de alilamina (fig 28). La reacción de coordinación cerca de una superficie fue muy poco eficiente, aún para tiempos de reacción prolongados (días), altas temperaturas (~95 °C) y/o alta concentracion de grupo protector ensayadas.

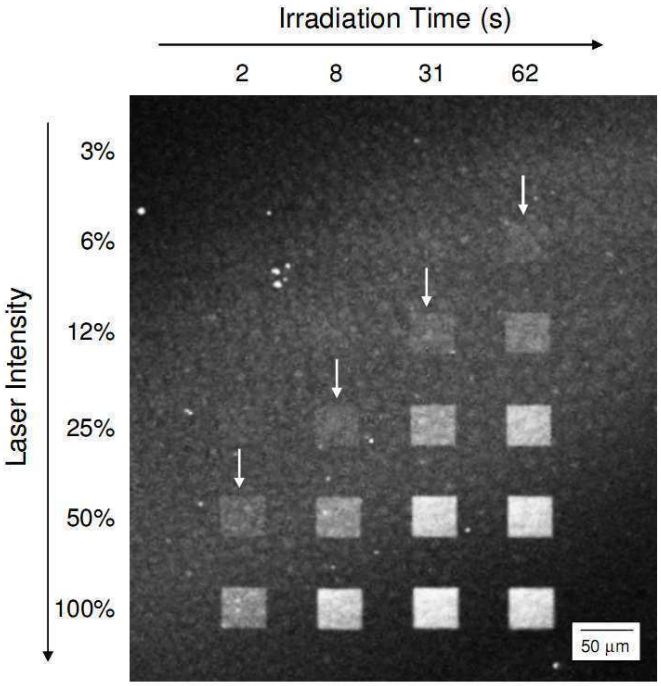


Figura 30: Fotólisis de $[Ru(bpy)_2(PMe_3)APTS]^{+2}$ en modo de excitación por dos fotones (2PE), revelado por reacción con AlexaFluor488.

Esta línea experimental fue continuada por Verónica San Miguel, del mismo laboratorio. Se usó el mismo grupo de anclaje a la superficie (APTS) pero el grupo protector $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(H_2O)]^{+2}$, que en los últimos años ha demostrado mayor eficiencia cuántica que $[Ru(bpy)_2Cl(H_2O)]^{+}$, la Ru-bpy usada anteriormente. La muestra fue fotolizada con un láser IR Ti:Za de 900 nm instalado en otro setup, en modo 2PE, para diferentes intensidades y tiempos de irradiación. La figura 30 muestra que la excitación en modo 2PE también es efectiva para fotorremover nuestros grupos protectores en superficices.

Respecto al setup para irradiar superficies con luz visible, el equipo construído cumple con lo requerido. El control completo por software minimizó la necesidad de "manuales de uso" brindando una interfase intuitiva, e hizo posible que la electrónica, los láseres, la óptica de colimación y los espejos de posicionamiento permanezcan protegidos y cubiertos durante el uso cotidiano.

Capítulo 2: Grupos protectores para nitrilos.

Introducción.

Nuestro laboratorio tiene experiencia en sintetizar compuestos de coordinación fotoliberables de aminas primarias (como la mayoría de los aminoácidos[28]) y de piridinas (4-aminopiridina, nicotina [29]). Esto nos permitió crear un conjunto de herramientas moleculares que cubren un subgrupo de las necesidades en la investigación en fisiología, dado que podemos desenjaular la mayoría de los aminoácidos [30] (como glutamato, glicina) además de GABA [31], nicotina, serotonina, y otras moléculas pequeñas bioactivas[13].

Sin embargo existen fármacos y biomoléculas pequeñas importantes que no poseen grupos amino libres, por lo tanto era interesante explorar las propiedades de moléculas coordinadas por otros grupos funcionales. Con la intención de ampliar el conjunto de herramientas disponible nos propusimos proteger nitrilos; un grupo de creciente interés bioquímico, que es menos básico que las aminas y piridinas que usualmente coordinamos, por lo tanto esperábamos bandas MLCT desplazadas hacia el azul, y buenas eficiencias cuánticas.

Nitrilos en moléculas fisiológicamente interesantes.

Existen más de 30 fármacos con grupos nitrilo aprobados para la venta, y más de 20 en etapa de ensayo clínico. Algunos ejemplos son:

Vildagliptina, un antidiabético (inhibidor de la DiPeptidilPeptidasa-4 [DPP4]).

Fadrozol, inhibidor no esteroide de la aromatasa (usado contra cáncer de mama).

Finrozol, un inhibidor de la aromatasa y de los efectos de la aldosterona.

L-778, 123: inhibidor doble de farnesiltransferasa y geranylgeranyl transferasa.

BMS 191095: bloqueante K^+-dependiente de canales de ATP, antihipertensivo.

Los efectos farmacológicos son variados: antipsicóticos, ansiolíticos, agonistas de subtipos específicos de receptores, antivirales (anti-HIV), antiartríticos, betabloqueantes, e inhibidores de proteasas (especialmente de catepsinas, con aplicaciones antimetastásicas [16]) que incluyen nitrilos, lo cual es una muestra de su versatilidad farmacológica. El grupo nitrilo en estas drogas cumple distintas funciones según el caso: es un bioisostérico de carbonilo por formación de puente de hidrógeno y de halógenos por su polarizabilidad. Participa en interacciones dipolo-dipolo con aminoácidos y iones metálicos. Exhibe funcionalidad especial por su enlace triple, polarizado, cilíndrico y pequeño (sistema $\pi < 4$ Å). [32] Ocupa 1/8 del volumen de un metilo, y es bioisostérico con metilo y halógenos. No es particularmente electrofílico, a menos que sea activado por grupos adyacentes electroaceptores, por lo cual no es metabolizado fácilmente y las drogas que lo contienen son eliminadas del organismo intactas, el riesgo de actividad biológica de los posibles metabolitos es muy bajo, lo que lo hace muy biocompatible. Diversas estructuras cristalográficas lo muestran con puentes de hidrógeno o interacciones polares en bolsillos proteicos pequeños, estéricamente impedidos.

Existe una tendencia en el diseño de drogas a reemplazar metilos y halógenos por nitrilos, puesto que estos últimos mejoran los índices ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity) y se ajustan a las reglas de Lipinski, [33, 34] usadas para evaluar biodisponibilidad y desempeño de drogas.

Dado que los nitrilos son grupos farmacológicamente interesantes, caracterizamos la fotoactividad de algunos complejos conteniendo nitrilos. Creemos que estos enjaulados serán herramientas útiles para la investigación de las interacciones droga-proteína y la fisiología celular involucrada.

Como caso especial, estudiamos además un complejo de Ru conteniendo una molécula fluorescente derivada de rodamina y coordinada a través de un nitrilo, cuya fluorescencia se ve apagada (*quenched*) en estado coordinado, y es recuperada al ser fotoliberada (figura 31).

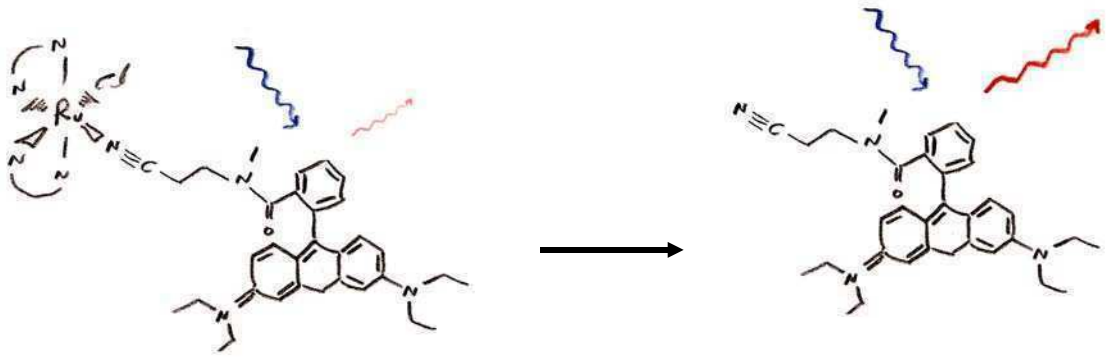


Figura 31. Esquema del fotoliberador de RhodaminaMAPN. Al ser irradiado, fotolibera rodaminaMAPN, cuya eficiencia de fluorescencia aumenta ~6 veces.

Materiales y Métodos.

Setup para espectroscopía UV-Vis y fotolisis a temperatura constante.

Sobre una mesa para banco óptico (Melles Griot, 70 x 70 cm de lado), de acero magnético, se montaron tres láseres de longitudes de onda 532 nm (Nd:YAG, 7 mW), 473 nm (DPSS, 4mW), y 405 nm (6 mW). Usando dos espejos dicroicos se hicieron coincidir las trayectorias de los láseres sobre la cubeta que contiene la muestra. Esta cubeta está alojada en un recipiente ajustado de aluminio, fabricado en el taller de acuerdo a nuestro diseño, el cual está en contacto térmico con un elemento semiconductor de efecto Peltier de 20W de potencia máxima. El sistema completo se alimenta con una fuente para PC de tipo ATX.

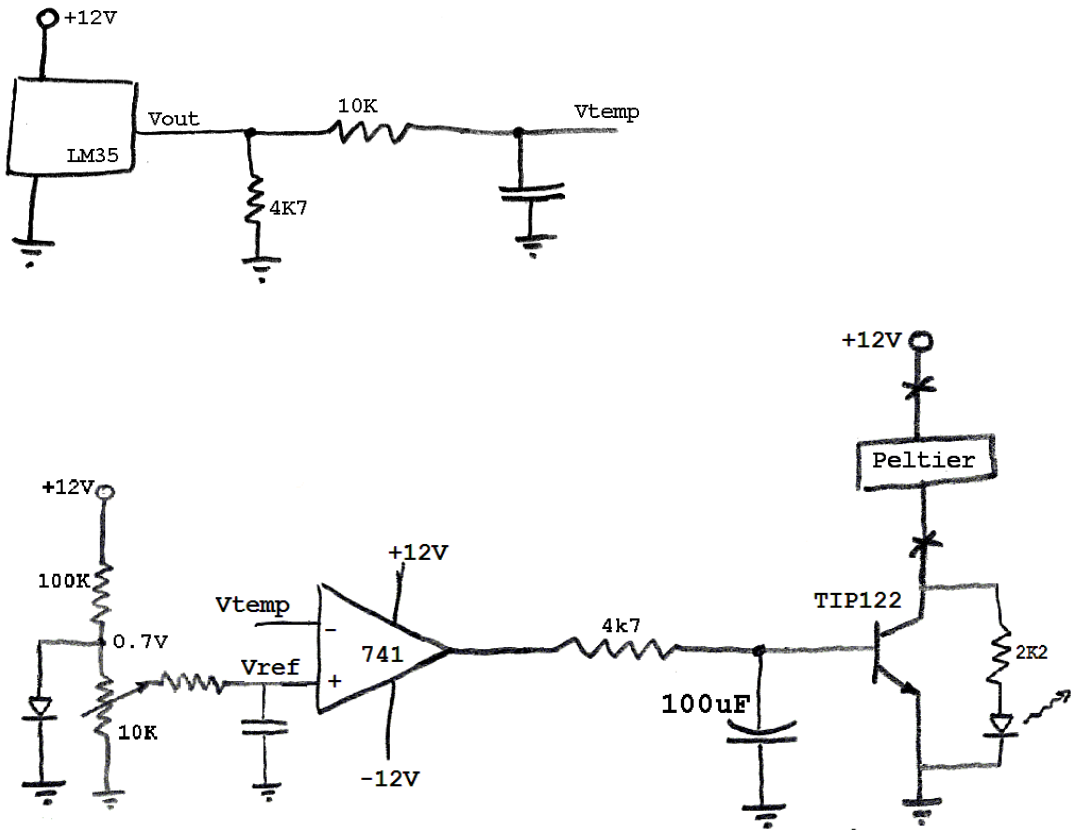


Figura 32: Circuito que regula la temperatura controlando la corriente a través de un elemento Peltier. Con un switch se invierte la polaridad del elemento Peltier (cruces), y se intercambian V_{ref} y V_{temp} según se necesite calentar o enfriar.

La corriente que circula por el Peltier (fig. 32) está controlada por un circuito de nuestro diseño y fabricación, lo que nos permite mantener la cubeta termostatizada en una temperatura a elección entre 0 °C y 110 °C (teóricos), con una precisión mejor que 0.2 °C. Un agitador magnético homogeneiza el contenido de la cubeta. Un espectrofotómetro Ocean Optics 2000 conectado a una PC que permite automatizar las mediciones de absorbancia, colecta la luz emitida en la dirección perpendicular a la dirección de incidencia de los láseres a través de una fibra óptica.

Método de Deconvolución de espectros.

Era necesario un método que nos permitiera conocer la eficiencia cuántica de la fotoliberación, calculado a partir de una serie de espectros tomados durante el transcurso de una fotólisis, para el caso en que tanto el reactivo como el producto absorben en el rango UV-Vis.

Supongamos una substancia A coloreada en solución que se convierte en una substancia B que no absorbe en el espectro visible. Si la concentración de A en la cubeta de reacción es tan alta que toda la luz incidente es absorbida, entonces el reactivo limitante es la luz. La velocidad de esta reacción puede escribirse como

$$(dn_B)/(dt) = I_0\ \phi$$

donde dn_B es la velocidad de cambio en moles de B en el diferencial de tiempo dt; y I_0 es el flujo de fotones de longitud de onda efectiva expresado en Einsteins / s medido justo antes de entrar en la cubeta; y ϕ es la eficiencia cuántica de la reacción (la probabilidad de dar producto cuando se ha absorbido un fotón). En estas condiciones, la reacción es de orden cero en el reactivo A.

Si la concentración de A no es tan alta, entonces un fotón tendrá cierta probabilidad de atravesar la cubeta sin ser absorbido. Por lo tanto multiplicando la ecuación anterior por la fracción absorbida ($1\text{-}10^{-Abs}$) obtenemos:

$(dn_B)/(dt) = I_0\, \phi\, (1\text{-}10^{-Abs})$; con $Abs = \varepsilon \cdot l \cdot c$.

con lo que la ecuación diferencial es no lineal y se prefiere resolverla numericamente.

Un problema adicional que existe para calcular el avance de las fotólisis de nuestros compuestos es que uno de los productos de la fotoliberación (el grupo protector, Ru-bpy) también absorbe en el espectro visible creando un efecto de "filtro interno". Por lo tanto la reacción de fotólisis se desvía del caso formulado más arriba por la presencia, en una concentración cada vez más alta, de una especie que captura fotones y no resulta en nuevo producto formado. En estas condiciones, la probabilidad de que un fotón sea absorbido por una molécula de reactivo depende de la relacion de absorbancias, y va cambiando a medida que la reacción progresa, es decir que el cambio en la cantidad de producto en el tiempo será:

$$\frac{dn_P}{dt} = I_{beam} \cdot \left(1 - 10^{-Abs_T}\right) \cdot \frac{Abs_R}{Abs_T} \cdot \varphi_{pr} \qquad (1)$$

Donde Abs_R es la absorbancia debido al reactivo, y Abs_T es la absorbancia total de la muestra. Para una mezcla de especies en solución, el espectro de absorbancia de una mezcla de especies será una combinación lineal de los espectros de cada una de éstas por su fracción molar:

Conociendo los espectros de las especies puras involucradas, podremos componer el espectro de la mezcla resultante. Recíprocamente, si tenemos el espectro de una mezcla de especies cuyos espectros conocemos, podemos descomponer el espectro mezcla en las concentraciones de cada especie involucrada.

Síntesis de complejos de la forma $[Ru(bpy)_2 X L]^{+2}$

Para X = 4-metilpiridina; L = benzonitrilo

67 mg (130 µmol) $Ru(bpy)_2Cl_2$ se suspenden en 10 ml de etanol y 2 ml de agua, y se calientan hasta disolución. Se agregan 20 µl de 4-metilpiridina (220 µmol) y la mezcla se calienta a reflujo durante 3 horas. Se rotoevapora para reducir el volumen, y se precipita con 500 µl de 0.5 M KPF_6 en agua. El precipitado se lava en agua fría y se seca en desecador. El producto se disuelve en 5 ml de acetona y 10 ml de agua y se agregan 5 equivalentes de benzonitrilo. Se precipita en caliente con 1 ml 0.5 M de KPF_6 en agua. Se filtra y se lava con agua y con éter. ^{1}H NMR (acetone-D_6) δ = 9.91 (1H, d, (bpy)), 8.91 (1H, d, (bpy)), 8.88 (1H, d, (bpy)), 8.76 (1H, d, (bpy)), 8.75 (1H, d, (bpy)), 8.68 (1H, d, (bpy)), 8.62 (1H), 8.44 (1H, t, (bpy)), 8.36 (1H, t, (bpy)), 8.14-8.2 (3H, m), 8.09 (1H, d, (bpy)), 8.02 (1H, t, (bpy)), 7.94 (1H, t, (bpy)), 7.55-7.78 (3H, m), 7.55-7.61 (3H, m), 7.49 (1H, t, (bpy)), 7.37 (1H, d), 2.40 (3H, s, Me).

Para X = PMe_3; L= Butenonitrlio

Se parte de $[Ru(bpy)_2(PMe_3)Cl]^+$ y se agregan 3 equivalentes de butenonitrilo.

^{1}H NMR (acetone-D_6) δ = 9.50 (1H, d, (bpy)), 9.40 (1H, d, (bpy)), 8.86 (1H, d, (bpy)), 8.83 (1H, d, (bpy)), 8.77 (1H, d, (bpy)), 8.68 (1H, d, (bpy)), 8.46-8.41 (2H, m), 8.23 (1H, t, (bpy)), 8.14 (1H, t, (bpy)), 8.07 (1H, d, (bpy)), 8.01 (1H, t, (bpy)), 7.97 (1H, t, (bpy)), 7.75 (1H, d, (bpy)), 7.58 (1H, t, (bpy)), 7.48 (1H, t, (bpy)), 5.78-5.71 (1H, m, H_2C=C$\underline{H}$-), 5.14 (1H, d, J=10Hz, H$\underline{H}_{cis}$C=CH-), 4.94 (1H, d, J=17Hz, H$\underline{H}_{trans}$C=CH-), 3.66-3.79 (2H, m, -C$\underline{H}_2$-CN), 1.32 (9H, d, J_{HP}=9Hz, PMe_3).

Para X = PPh_3; L= Butenonitrlio

Se parte de $[Ru(bpy)_2(PPh_3)Cl]^+$ y se agregan 3 equivalentes de butenonitrilo.

^{1}H NMR (acetone-D_6) δ = 9.24 (1H, d, (bpy)), 8.92 (1H, d, (bpy)), 8.89 (1H, d, (bpy)), 8.82 (1H, d, (bpy)), 8.65 (1H, d, (bpy)), 8.63 (1H, d, (bpy)), 8.43 (1H, t, (bpy)), 8.27 (1H, t, (bpy)), 8.20 (1H, t, (bpy)), 8.10 (1H, t, (bpy)), 7.79 (1H, t, (bpy)), 7.55-7.63 (3H, m), 7.47-7.53 (4H, m), 7.29-7.39 (12H, m), 7.26 (1H, t, (bpy)), 5.63-5.73 (1H, m, H_2C=C<u>H</u>-), 5.16 (1H, d, J=10.5Hz, H<u>H</u>$_{cis}$C=CH-), 4.97 (1H, d, J=17Hz, H<u>H</u>$_{trans}$C=CH-), 3.71-3.75 (2H, m, -C<u>H</u>$_2$-CN).

Para X = PMe_3; L= Cianofenol

Se parte de $[Ru(bpy)_2(PMe_3)Cl]^+$ y se agregan 3 equivalentes de cianofenol.

^{1}H NMR (acetone-D_6) δ = 9.73 (1H, d, (bpy)), 9.45 (1H, d, (bpy)), 8.85 (2H, d, (bpy)), 8.76 (1H, d, (bpy)), 8.70 (1H, d, (bpy)), 8.41-8.44 (2H, m, (bpy)), 8.21 (1H, t, (bpy)), 8.16 (1H, t, (bpy)), 8.12 (1H, d, (bpy)), 8.00 (1H, t, (bpy)), 7.96 (1H, t, (bpy)), 7.78 (1H, d, (bpy)), 7.58 (1H, t), 7.47-7.54 (1H, m), 7.44(1H, t), 7.38 (1H, d), 6.97 (1H, d), 6.77 (1H, t), 1.37 (9H, d, J_{HP}=9Hz, PMe_3).

Síntesis del complejo $[Ru(bpy)_2Cl(RhodMAPN)]^+$.

20 mg de $Ru(bpy)_2Cl_2$ se suspenden en 2 ml de etanol. Se agregó 1 equivalente de RhodBMAPN y se calentó a 80ºC con agitación durante 2 horas (la reaccción se sigue por TLC). La solución se filtró y se llevó a seco en rotoevaporador, obteniéndose un aceite que se disolvió en 4 ml de una mezcla acetona:metanol 3:1. Se agregó exceso de THF obteniendo el complejo como único precipitado, el cual se filtró y se lavó con THF. Para purificarlo se lo redisolvió en 3 ml de agua y se precipitó con 2 equivalentes

de KPF_6. Luego del cambio de contraiones el complejo $[Ru(bpy)_2(RhodBMAPN)Cl]^+$ como sal de Cl^-, soluble en agua, se liofilizó.

Procedimiento para analizar y medir velocidades de fotólisis:

Una pequeña cantidad conocida de reactivo A se disuelve en un volumen conocido de solvente en una cubeta de fluorescencia. La cubeta se coloca en el portacubetas termostatizado, y se mide (generalmente) un espectro por segundo mientras la solución llega a la temperatura deseada en la oscuridad. En cierto momento (t=0) se inicia la irradiación con un láser de potencia y longitud de onda elegida, y se espera hasta que la reacción llegue a completitud (> 90 %), monitoreando en una longitud de onda en particular para poder "ver" con facilidad el progreso de la reacción. Tomamos unos últimoos espectros después de un tiempo largo de irradiación para asegurarnos que la reacción se ha completado. El resultado es una serie de espectros iniciales (EI, en oscuridad), una serie de espectros intermedios (EM, durante la fotólisis, del orden de 100) y un conjunto de espectros finales (EF, fotólisis total). Con un pequeño grupo de espectros iniciales y finales armamos un espectro promedio inicial y un espectro promedio final. Los espectros intermedios pueden ser promediados de a grupos para obtener espectros intermedios con menos ruido.

E describe a continuación un método "manual" de fotólisis que fue usado para fotolizar los complejos de nitrilo (excluyendo los ligandos MAPN y RhodB-MAPN en el estudio de transferencia de energía y efecto antena). Brevemente: Los espectros de de complejos en concentraciones y cantidades conocidas con presición se midieron con un espectrofotómetro HP8453. Para las fotólisis se usó un LED Luxeon Star III Royal

Blue centrado en 450 nm, 20 nm FWHM con una fuente estabilizada, montado frente a un portacubetas. La irradiancia efectiva de la fuente de luz fue determinada con un compuesto de referencia $[Ru(bpy)_2(py)_2]^{2+}$ de eficiencia cuántica conocida [11]. Los espectros obtenidos se analizan según el método descripto en "*Tratamiento de datos*".

Tratamiento de datos: Primero reconstruímos la reacción de fotólisis a partir del conjunto de espectros: un algoritmo toma cada uno de los espectros medidos y los expresa como combinación lineal del promedio de espectros iniciales, y el promedio de espectros finales. Para ello ajusta un parámetro α en la expresión EM=(α · EI + (1-α) · EF) donde EM es el promedio de Espectros Iniciales, EF es el promedio de Espectros Finales, EI es uno de los espectros intermedios, y α y (1-α) expresan la contribución de cada uno de ellos al (EM).

Una vez que tenemos una tabla de valores de α y sus tiempos (donde tiempo es convertible a einsteins), otro algoritmo minimiza el cuadrado de las diferencias entre la curva de fotólisis reconstruída desde los espectros (la curva de valores de α) y la curva predicha por la ecuación (1), ajustando el valor de φ. Un único valor de φ tiene que explicar todo el proceso, y es el valor de la eficiencia cuántica de la reacción de fotólisis, para la temperatura y longitud de onda usadas. La ventaja de este método combinado es que se reconstruye el progreso de la reacción a partir de los espectros completos obtenidos, en lugar de seguir la reacción midiendo el cambio de absorbancia a una única longitud de onda. En caso de que los espectros difieran lo suficiente, la medición a una λ única también arroja resultados reproducibles y precisos.

Resultados y discusión.

Complejos de rutenio conteniendo nitrilos.

Con el objeto de caracterizar el comportamiento fotoquímico de distintos complejos de Ru-bpy con nitrilos, se sintetizaron complejos de rutenio con cuatro nitrilos diferentes como ligandos. Seis de la forma $[Ru(bpy)_2\ X\ L]^{+2}$; cubriendo la combinatoria de X = trimetilfosfina (PMe_3); trifenilfosfina (PPh_3); 4-metilpiridina

L = 3-butenonitrilo ; 2-cianofenol

Ademas se sintetizó un complejo donde X=4-metilpiridina, L=benzonitrilo.

Las figuras 33 a 39 muestran la secuencia de espectros durante la fotólisis de los compuestos sintetizados. En todos los casos, el "primer" espectro es el que presenta su banda MLCT hacia el azul, y el producto de fotólisis, hacia el rojo.

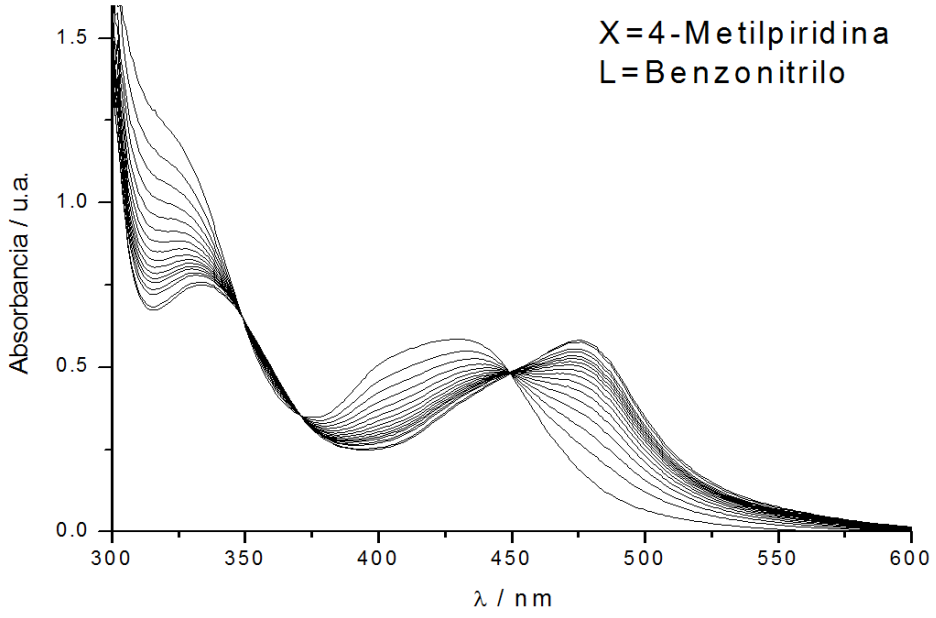


Figura 33: Espectros UV-Vis de la fotólisis del complejo $[Ru(bpy)_2(4\text{-}MePy)(benzonitrilo)]^{+2}$

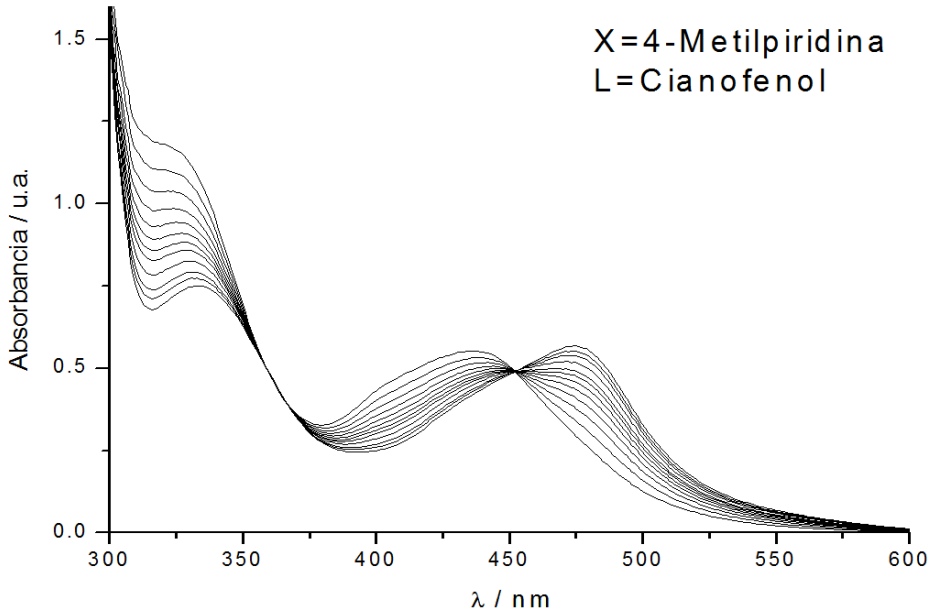


Figura 34: Espectros UV-Vis de la fotólisis del complejo $[Ru(bpy)_2(4\text{-}MePy)(cianofenol)]^{+2}$

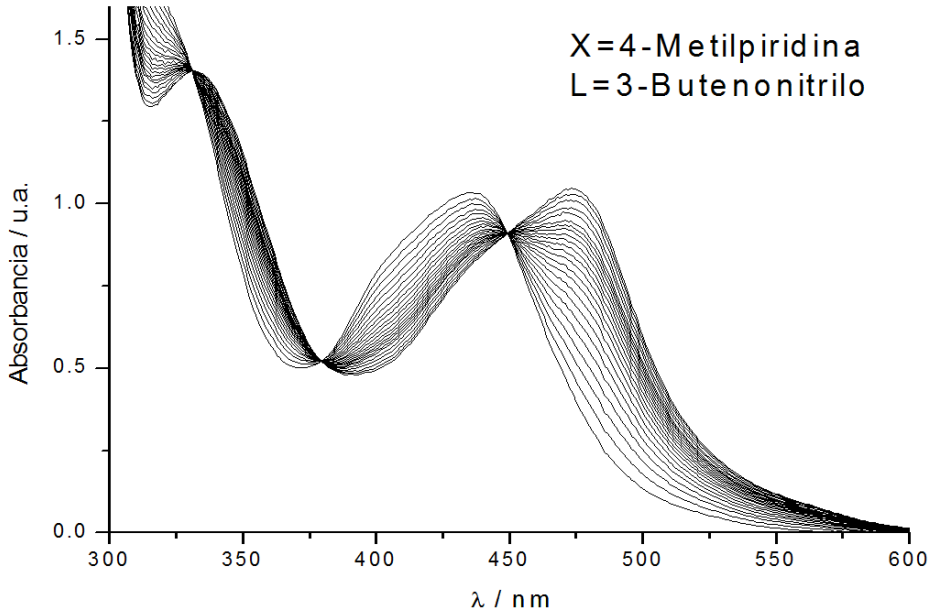


Figura 35: Espectros UV-Vis de la fotólisis del complejo $[Ru(bpy)_2(4\text{-}MePy)(butenonitrilo)]^{+2}$

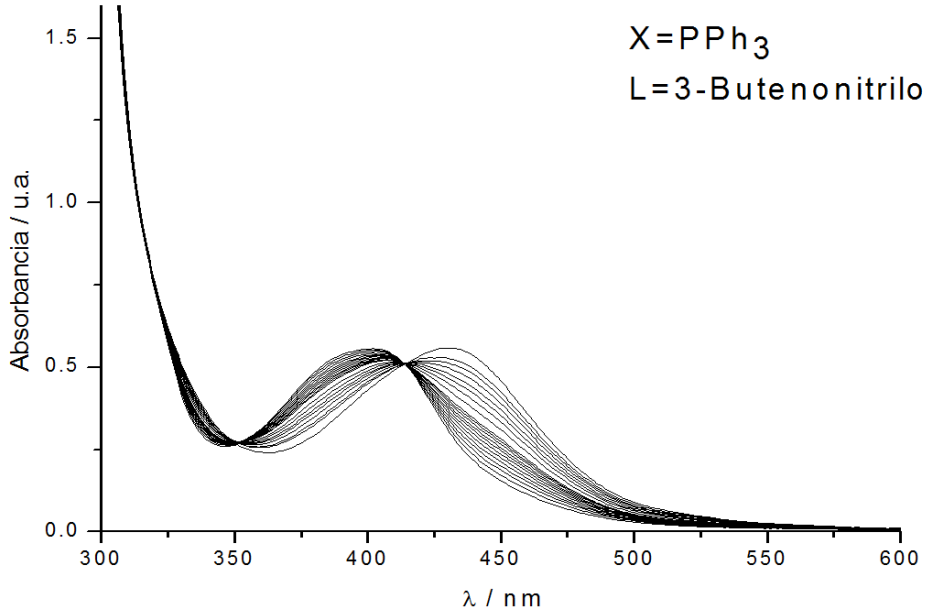


Figura 36: Espectros UV-Vis de la fotólisis del complejo $[Ru(bpy)_2(PPh_3)(butenonitrilo)]^{+2}$

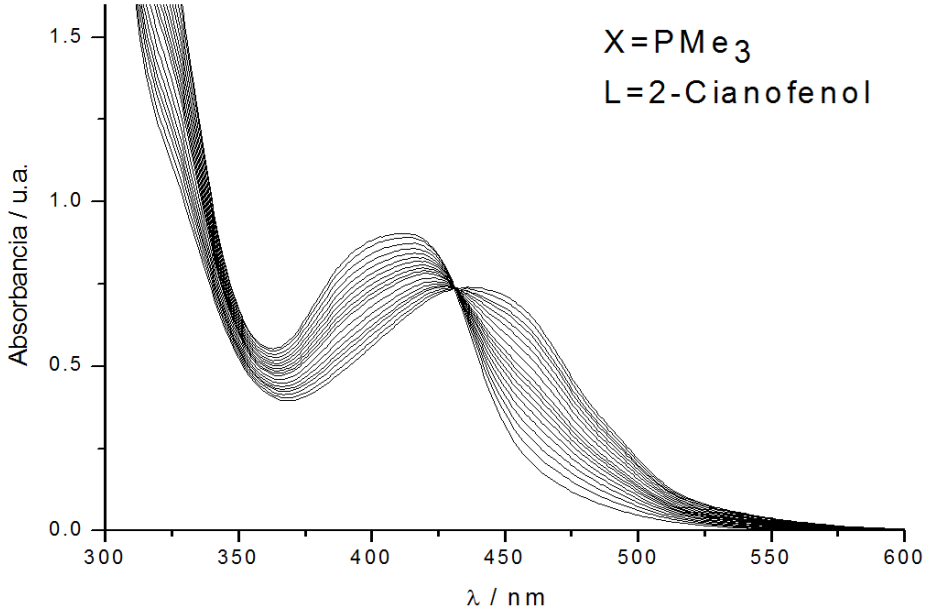


Figura 37: Espectros UV-Vis de la fotólisis del complejo $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(cianofenol)]^{+2}$

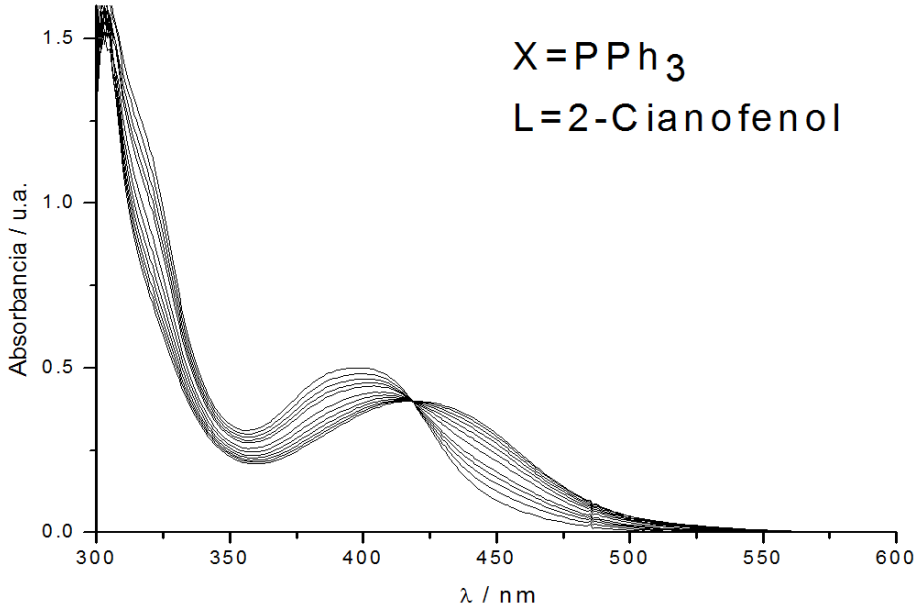


Figura 38: Espectros UV-Vis de la fotólisis del complejo [Ru(bpy)$_2$(PPh3)(cianofenol)]$^{+2}$

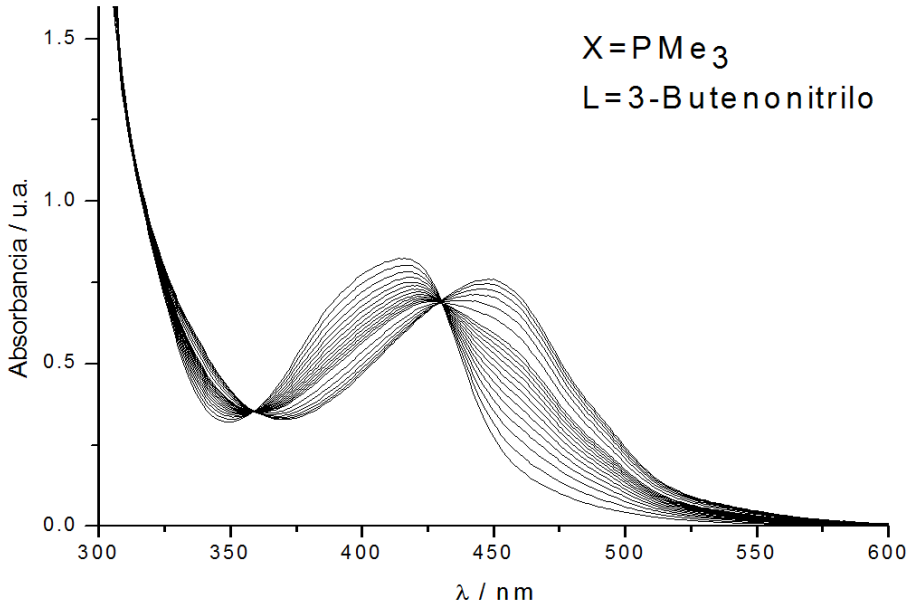


Figura 39: Espectros UV-Vis de la fotólisis del complejo [Ru(bpy)$_2$(PMe$_3$)(butenonitrilo)]$^{+2}$

Las figuras 40 a 44 muestran los espectros de los mismos complejos agrupados según diferentes criterios, para resaltar las propiedades que se describen mas abajo.

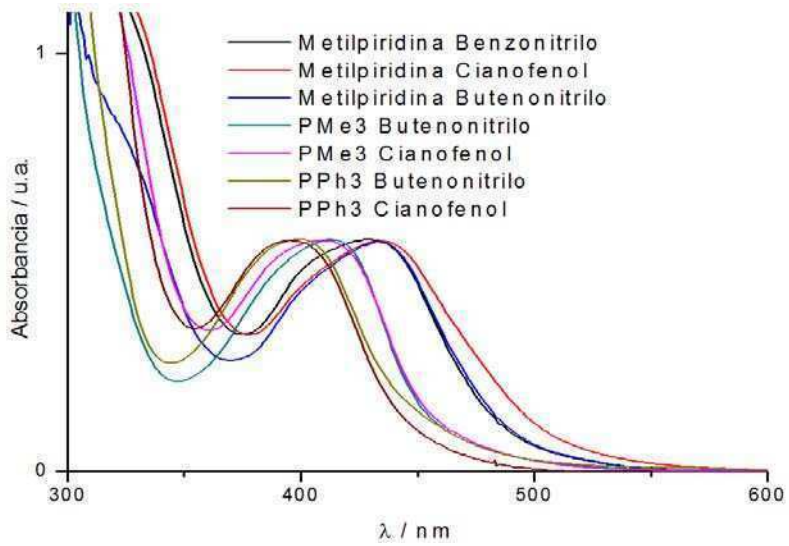


Figura 40: Espectros UV-Vis de todos los complejos con nitrilos sintetizados.

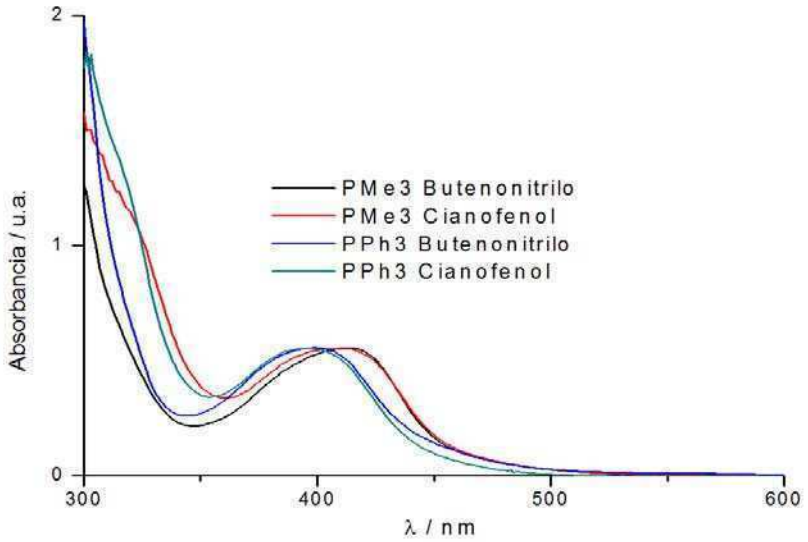


Figura 41: Espectros UV-Vis de complejos con PMe_3 o PPh_3.

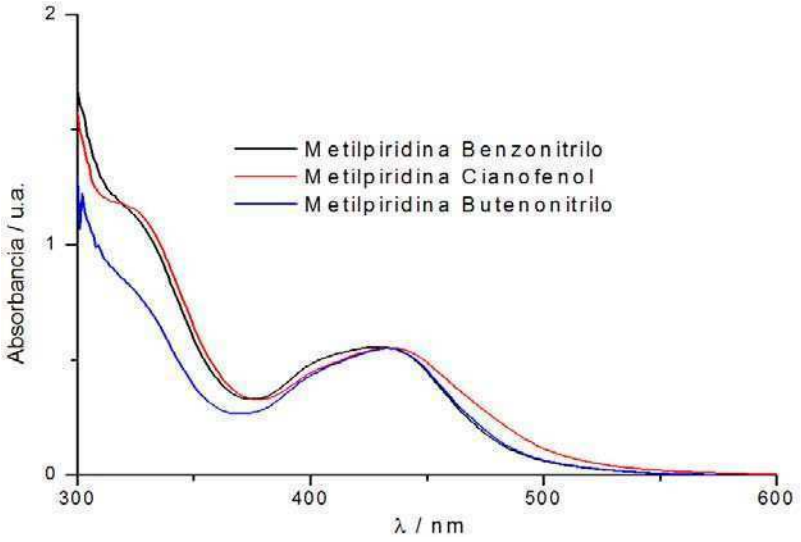


Figura 42: Espectros UV-Vis de complejos con 4-metilpiridina.

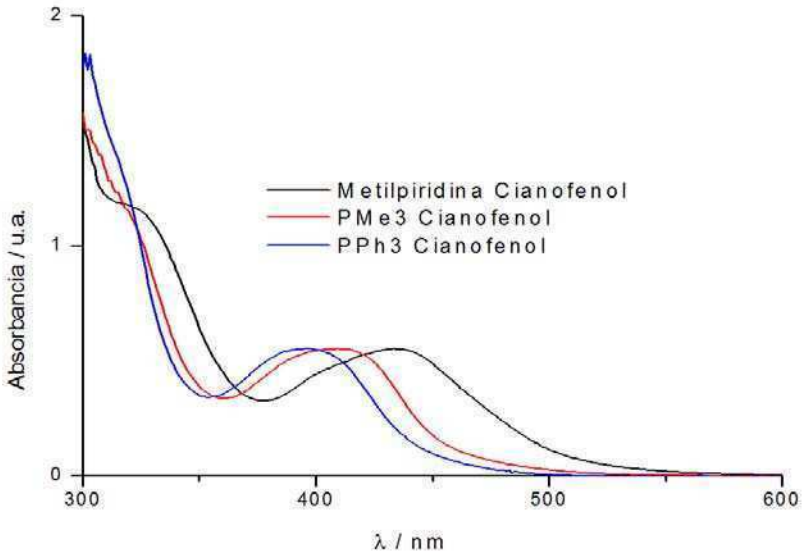


Figura 43: Espectros UV-Vis de complejos con 2-cianofenol.

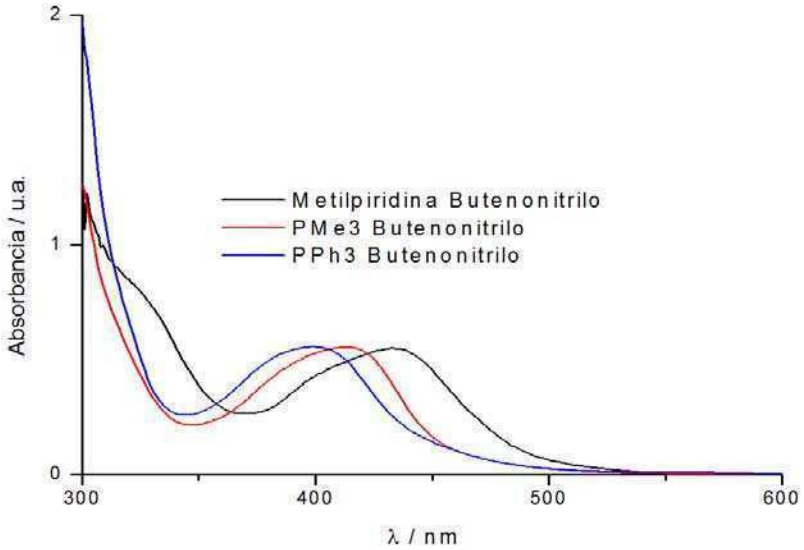


Figura 44: Espectros UV-Vis de complejos con butenonitrilo.

La lista de complejos sintetizados es

$[Ru(bpy)_2(4\text{-metilpiridina})(benzonitrilo)]^{+2}$

$[Ru(bpy)_2(4\text{-metilpiridina})(cyanofenol)]^{+2}$

$[Ru(bpy)_2(4\text{-metilpiridina})(3\text{-butenonitrilo})]^{+2}$

$[Ru(bpy)_2(PMe_3)(3\text{-butenonitrilo})]^{+2}$

$[Ru(bpy)_2(PMe_3)(2\text{-cianofenol})]^{+2}$

$[Ru(bpy)_2(PPh_3)(3\text{-butenonitrilo})]^{+2}$

$[Ru(bpy)_2PPh_3(2\text{-cianofenol})]^{+2}$

Los resultados obtenidos están de acuerdo con las observaciones de Pinnick & Durham para complejos de rutenio y bipiridinas para complejos de rutenio y bipiridinas [11], y pueden resumirse del siguiente modo (ver tabla 2, página 109):

Para un conjunto de complejos de la forma $Ru(bpy)_2XL$, donde el ligando es una molécula con un grupo nitrilo a traves del cual está coordinada, el orden de los máximos de absorbancia según el 5^{to} ligando es:

PPh_3 > PMe_3 > Picolina

Esta es también la secuencia que obtenemos si ordenamos los ligandos por la eficiencia cuántica resultante para el complejo.

Estos resultados coinciden, además, con lo observado en el laboratorio para ligandos coordinados por una amina primaria, como es el caso de los neurotransmisores y aminoácidos.

Si hacemos el mismo análisis para los ligandos fotoactivos, obtenemos:

Butenonitrilo > Cianofenol > Benzonitrilo.

Aunque en este caso las diferencias son mucho menos marcadas.

En primer lugar, notamos que la posición del máximo de absorbancia en el espectro resulta mejor determinada por el ligando X que por el ligando L. (comparar figuras 41 y 42 versus 43 y 44). Esto se debe a que los ligandos X difieren más entre sí que los ligandos L. Las piridinas son muy diferentes de las fosfinas, y además estas últimas presentan distintos sustituyentes en el fósforo coordinante. Por el contrario, los primeros dos átomos del nitrilo (NC-R) son invariantes, y las diferencias entre los distintos ligandos L utilizados aparecen en la posición 3 o superior (grupo unido al grupo nitrilo), mientras que las diferencias entre los ligandos X aparecen ya en la primera o segunda posición (fosfina versus piridina, por ejemplo). Dicho de otro modo: los ligandos L se parecen más entre sí que los ligandos X, por lo tanto lo

observado está de acuerdo con la idea de que los átomos próximos al metal influyen más sobre el campo ligante que los átomos más alejados.

En segundo lugar, en las figuras 43 y 44 se aprecia que los ligandos 4-metilpiridina, trimetilfosfina, trifenilfosfina (en ese orden) tienen efectos crecientes sobre el corrimiento al violeta de la banda MLCT.

En tercer lugar, vemos una tendencia en las eficiencias cuánticas relativas: los complejos de 3-butenonitrilo resultan tener, en general, mayor eficiencia cuántica que los de 2-cianofenol para los complejos con X=4-metilpiridina y con X=PMe_3, y de eficiencias muy similares si X=PPh3. Por otro lado el complejo con benzonitrilo y 4-metilpiridina, tiene una eficiencia cuántica intermedia, lo cual también es razonable, si consideramos que el aporte de densidad electrónica de un fenol hacia el nitrilo será algo mayor que la de un bencilo.

Transferencia de energía y efecto antena.

RuBiRhod es un complejo de la forma $[Ru(bpy)_2XL]^{n+}$ en el que X es Cl^- y L es una rodamina B modificada con metilaminopropionitrilo (RhodB-MAPN) como se muestra en la figura 45.

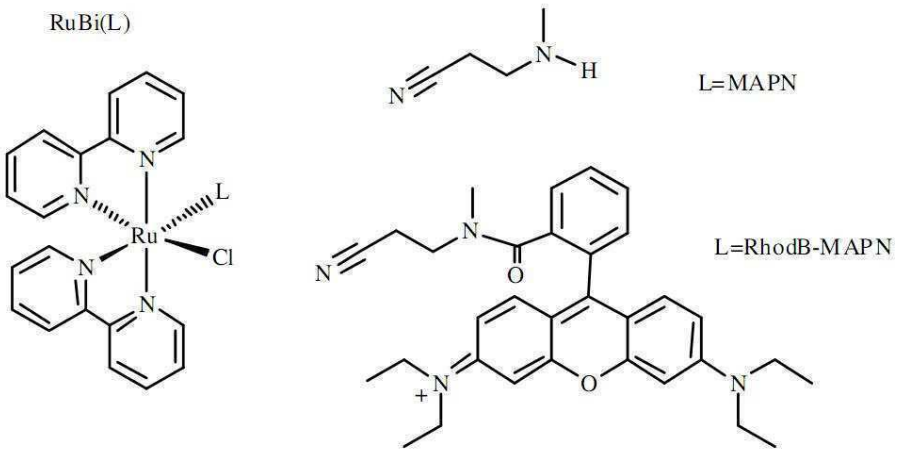


Figura 45: Estructuras de los complejos $[Ru(bpy)_2Cl(L)]^+$ para los dos ligandos MAPN y RhodB-MAPN usados en esta sección: RuBiMAPN donde L=MAPN, y RuBiRhod con L=RhodB-MAPN.

RhodB-MAPN es un ligando fluorescente que se obtiene tras la amidación del ácido carboxílico de Rodamina B usando N-Metilaminopropionitrilo (MAPN). El nitrilo terminal coordina al complejo de Ru-bpy dando $[Ru(bpy)_2(RhodB\text{-}MAPN)Cl]^+$. La síntesis del ligando, el complejo, y aplicaciones analíticas fueron descriptas anteriormente. [35]

Sin embargo, no se sabía porqué la coordinación al centro metálico disminuye la fluorescencia del fragmento RhodB-MAPN. Para intentar responder esto, estudiamos las propiedades y el comportamiento fotoquímico de un complejo de MAPN, y los comparamos con el comportamiento de un complejo análogo conteniendo nitrilo que constituye también una forma muy simple de sintonizar las propiedades de absorción de estos complejos.

La intesidad de fluorescencia de una solución de RuBiRhod es ~0.17 veces la del ligando libre, RhodB-MAPN. Esta intensidad aumenta al irradiar con luz azul (400-473 nm) lo que concuerda con la esperada fotoliberación del ligando, RhodB-MAPN (figura 46).

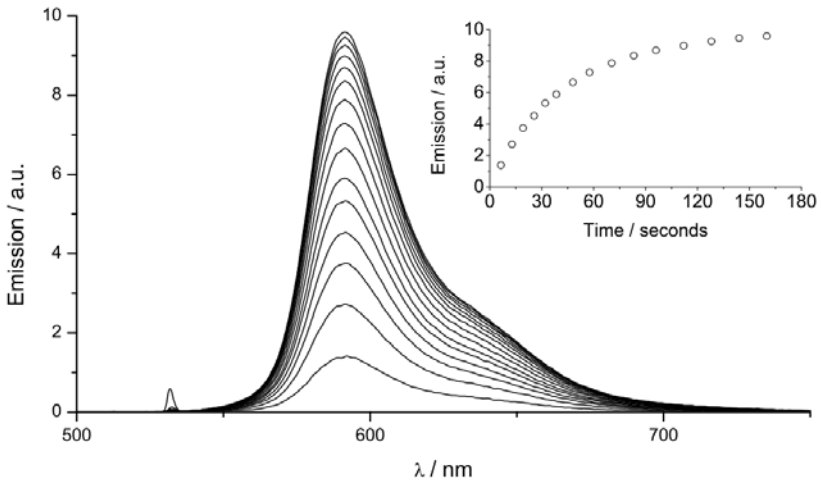


Figura 46: Espectros de emisión de una solución 10 μM de $[Ru(bpy)_2(RhodB\text{-}MAPN)Cl]^+$ tomados uno cada 10 segundos durante su irradiación con un láser de 532 nm. Inserto: intensidades en el máximo de emisión versus tiempo de irradiación.

Debido al solapamiento de espectros de absorbancia, la medición directa del coeficiente de extinción molar (ϵ) es técnicamente difícil, sin embargo dado que los fragmentos moleculares alejados uno o más enlaces del punto de coordinación prácticamente no tienen efecto en las bandas de absorción del complejo, podemos hacer una buena estimación de este coeficiente usando el complejo análogo $[Ru(bpy)_2(MAPN)Cl]^+$ (RuBiMAPN), que está coordinado al Ru del mismo modo que RuBiRhod (ver figura 41). El valor de RuBiMAPN es ϵ_{max}=6300 M^{-1} cm^{-1} a λ= 469 nm.

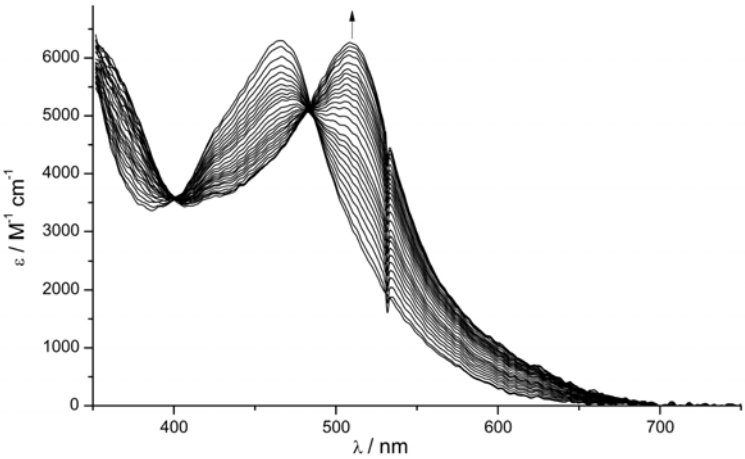
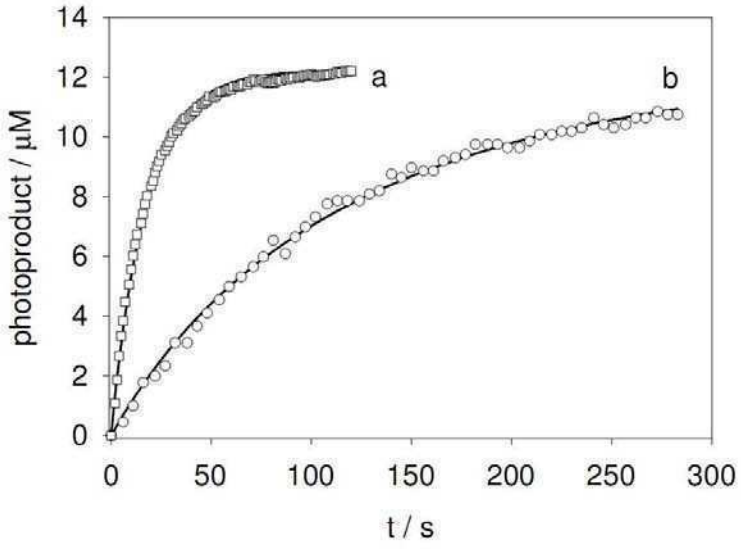


Figura 47: Espectros de absorbancia de RuBiMAPN durante su fotólisis con un láser de 532 nm. La flecha indica el progreso de la reacción.

Para comparar la fotoactividad de estos complejos a 532 nm ambos fueron fotolizados en las mismas condiciones (concentración, volumen, temperatura, solvente, etc) en nuestro setup para seguir reacciones de fotólisis.

La figura 48 muestra los datos experimentales de estas dos fotólisis, para RuBiRhod (a) y para RuBiMAPN (b), y el ajuste del avance de las reacciones según la integración numérica de la ecuación (1).

Figura 48: Cantidad de ligando libre versus tiempo de irradiación para $[Ru(bpy)_2(RhodB\text{-}MAPN)Cl]^{+2}$ (a,□) y para $[Ru(bpy)_2(MAPN)Cl]^{+}$ (b, ○). Las líneas curvas indican el ajuste a la cantidad de fotoproducto esperado según la resolución por métodos numéricos de la ecuación (1)



Resulta evidente de los experimentos de fotólisis (figura 48) que la RhodB-MAPN coordinada aumenta la facilidad de la fotodisociación. Este efecto no se debe a la simple presencia de RhodB-MAPN en solución, puesto que la misma cantidad de ligando RhodB-MAPN añadido a la cubeta de fotólisis de RuBiMAPN disminuye, y no aumenta, la velocidad de la reacción, lo cual es lo esperado al agregar al recipiente de reacción un compuesto absorbente.

Las eficiencias cuánticas de fotoliberación según la resolución numérica resultan $\varphi_{pr} = 0.145$ para RuBiMAPN y $\varphi_{pr} = 0.070$ para RuBiRhod, ambos medidos en etanol, a 25 °C y 532 nm de irradiación.

Una buena medida de la eficacia de un grupo protector para capturar luz y fotoliberar la molécula enjaulada es la "fotoactividad", definida como el coeficiente de absortividad molar, multiplicado por la probabilidad de dar fotoproducto ($\epsilon \cdot \phi$) para una cierta longitud de onda.

Para RuBiMAPN $(\epsilon \cdot \phi)_{532}$ = 0.145 x 1700 = 246;

Para RuBiRhod $(\epsilon \cdot \phi)_{532}$ =0.07 x 84500 = 5920.

Este último es siete veces mayor que, por ejemplo, el del fotoliberador de glutamato RuBiGlu a 450 nm, que es de ($\phi \cdot \epsilon_{450}$ = 780) y es el fotoliberador de glutamato con fotoactividad más alta disponible.

La fotoactividad inesperadamente alta de RuBiRhod sólo puede explicarse por su altísima absortividad a 532 nm: mientras RuBiMAPN exhibe la absortividad típica de esta clase de compuestos (ε_{532} = 1700 M^{-1} cm^{-1}) la absortividad de RuBiRhod es mucho más alta, debido a la presencia del grupo rodamina (ε_{532} = 84500 M^{-1} cm^{-1}). Esta relación de absortividades implica que sólo un 2% de los fotones son capturados por la vía típica del sistema Ru-bpy. La alta fotoactividad de RuBiRhod sólo se explica si una alta proporción de la energía capturada por la rodamina es transferida al sistema Ru-bpy.

Proponemos, por lo tanto que es posible, con un fluoróforo excitable coordinado, poblar los estados disociativos del complejo Ru-bpy resultando en la fotólisis del ligando.

Modelo FRET de transferencia de energía.

Tanto los espectros de absorbancia como de fluorescencia de RhodB-MAPN coordinado son muy similares a los de la molécula libre. Esto sugiere que la

estructura de estados electrónicos y vibracionales de RhodB-MAPN no cambia al coordinar el metal. La transferencia de energía propuesta es compatible con un mecanismo clásico de tipo FRET (Förster Resonant Energy Transfer). FRET es un mecanismo no-radiativo en el que los dipolos de transición del donor (D) y el aceptor (A) establecen resonancia. La eficiencia de la transferencia de energía depende esencialmente de tres factores: el grado de superposición de los espectros de absorbancia de A y de emisión de D; orientación relativa de sus dipolos de transición; y la distancia entre D y A.

Podemos calcular la eficiencia de FRET según:

$$\phi_{FRET} = \frac{1}{1+(r/R_0)^6}$$

donde r es la distancia entre D y A, y R_0 es la distancia característica, según:

$$R_0^6 = 8.79 \cdot 10^{-5} \frac{\kappa^2 \phi_f}{n^4} \int f_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \qquad (2)$$

donde k^2 es el factor de orientación relativa de los dipolos (se suele asumir k^2=2/3). φ_f es la eficiencia cuántica de fluorescencia del donor, n es el índice de refracción del medio, y f_D es el espectro normalizado (de área = 1) del donor, ε_A es el espectro de absortividad molar y λ la longitud de onda en nanómetros, la integral es llamada "integral J de solapamiento". R_0 resulta en Ångströms y representa la distancia crítica de transferencia de energía a la cual la transferencia y la desexcitación de D por otras vías son equiprobables.

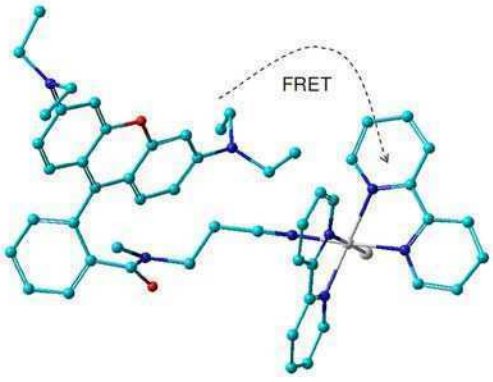


Figura 49: Modelo molecular para estimar la distancia Donor-Aceptor por la que ocurre FRET.

Normalmente se eligen D y A de modo tal que ocurra FRET a distancias de decenas de nanómetros, para lo cual es importante una buena superposición de espectros dado que la eficiencia cae con la sexta potencia de la distancia. Sin embargo a tan corta distancia como es este caso, una superposición pequeña puede garantizar una alta efciencia de FRET. Esto permite la transferencia de energía entre un donor cuyo espectro de emisión está casi totalmente hacia el rojo (aunque superpuesto) respecto al espectro de absorbancia del aceptor. Este efecto ya ha sido descripto en particular para fluoresceína como donora emitiendo en verde y cumarina como aceptora absorbiendo hacia el azul.[36]

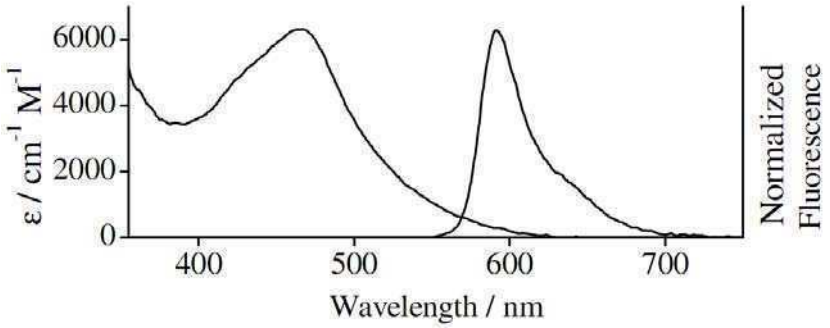


Figura 50: Absorbancia de RuBiMAPN (Izq), fluorescencia normalizada de RhodB (der)

Asumiremos que RhodB-MAPN actúa como donor, y el sistema Ru-bpy como aceptor. La figura 50 muestra los espectros de absorbancia de RuBiMAPN y de emisión de RuBiRhod, normalizados. El espectro de absorbancia del aceptor se solapa con el espectro de emisión del donor. La integral de solapamiento puede verse en la figura 51.

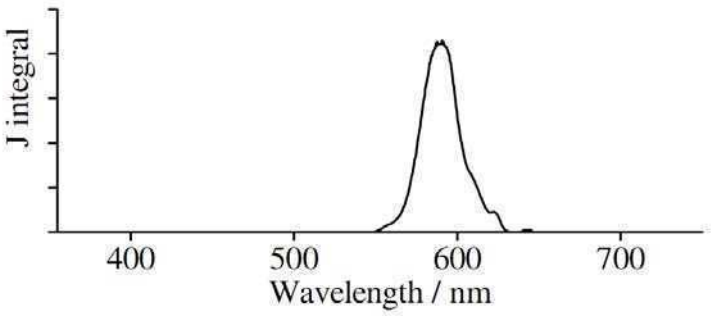
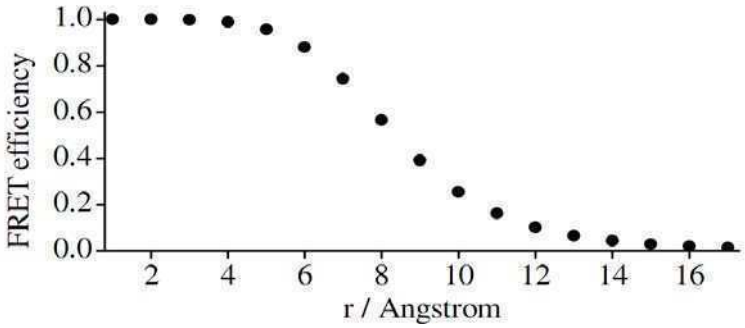


Figura 51: Integral de solapamiento, J.

Aunque la integral de solapamiento es en efecto pequeña, la distancia característica R_0 para la cual $\varphi_{FRET} = 0.5$ es 8.36 Å (figura 47), distancia similar a la calculada sobre un modelo molecular cuya energía fue minimizada con el método de Hückel.

Figura 52: Eficiencia de FRET versus distancia, usando los datos mostrados en las figuras 50 y 51.



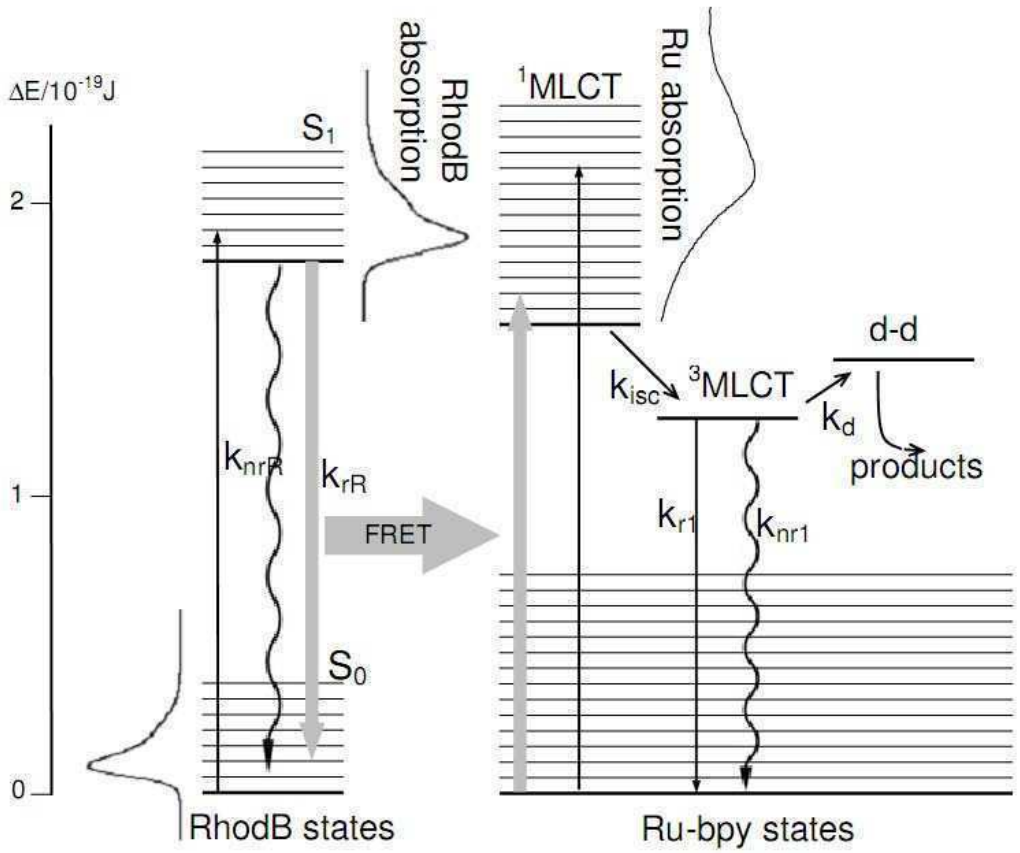


Figura 53: Diagrama de los sistemas RhodMAPN y Rubpy, y la interacción propuesta.

La figura 53 muestra un diagrama de Jablonsky para el sistema RuBiRhod. Puede ocurrir absorción de fotones tanto por la transición ^{1}MLCT de Ru-bpy como por la transición S_1 de RhodB-MAPN. Si un fotón de alta energía causa una transición ^{1}MLCT, el sistema evolucionará según la fotoquímica clásica de Ru-bpy. Si en cambio se absorbe un fotón causando una transición al estado excitado S_1 de RhodB-MAPN* la energía puede ser emitida por vía radiativa, perdida por decaimiento no-radiativo, o transferida por resonancia al sistema Ru-bpy por FRET, poblando el estado disociativo y eventualmente liberando un ligando (que en este caso, es la misma RhodB-MAPN).

A partir de las mediciones realizadas, se pueden hacer algunas estimaciones numéricas. La eficiencia de fluorescencia de RhodB-MAPN es $\varphi_{fRhodB\text{-}MAPN} = 0.51$, mientras que la eficiencia de fluorescencia de rodamina es $\varphi_{fRhodB} = 0.70$. Esta diferencia puede deberse a que el MAPN permite formas adicionales de relajación por interacción con el solvente.

Este valor de la eficiencia de fluorescencia (0.51) es la relación de constantes $k_{rR}/(k_{rR}+k_{nrR})$ (donde k_{rR} y k_{nrR} son las constantes de decaimiento radiativo y no radiativo, respectivamente). Una vez coordinado al centro metálico, este valor cae a 0.08, lo cual puede deberse a un aumento de la relajación no-radiativa (k_{nrR} mayor), y a FRET (k_{FRET}).

Asumiendo que la probabilidad de relajamiento no-radiativo de RhodB-MAPN no cambia al coordinarse al Ru, $\Phi_{FRET} = k_{FRET}/(k_{FRET}+k_{nrR}+k_{rR})$ y puede calcularse como $1 - (\Phi_{fRuBiRhod} / \Phi_{fRhodB\text{-}MAPN}) = 0.84$, lo cual corresponde a una distancia D-A de 6.2 Å (figura 47), dentro del 15% de diferencia con lo estimado por modelado molecular.

Si usamos los valores de RuBiMAPN para estimar la eficiencia cuántica de fotoliberación de un ligando en caso de captura inicial de un fotón por RhodB-MAPN, obtenemos un valor máximo estimado de $\Phi_{pr} = \Phi_{FRET} \times \Phi_{pr(RuMAPN)} = 0.84 \times 0.145 = 0.122$. El valor experimental es $\Phi_{pr}=0.070$ indicando que parte de la energía se pierde en algún otro proceso en el sistema Ru-bpy.

Estos resultados implican que es posible incorporar un fluoróforo al grupo protector y lograr que parte de la energía capturada por el fluoróforo excite la transición ^{1}MLCT del sistema Ru-bpy, liberando fotoproductos. Como los fluoróforos tienen comunmente coeficientes de extinción molar muy superiores (x200 a longitud de onda larga) a los de Ru-bpy, esto permite reducir mucho la cantidad de luz incidente sobre el sistema estudiado, porque la fotoactividad $\varepsilon \cdot \varphi$ aumentará mucho respecto al sistema sin cromóforo añadido.

Capítulo 3: Regulación de genes con luz.

Introducción.

Los compuestos enjaulados que nuestro laboratorio ha venido desarrollando originalmente estaban orientados a las neurociencias, [13, 26, 28, 37-39] , motivados por la abundancia y diversidad de moléculas neuroactivas, y la respuesta rápida del sistema nervioso, típicamente del orden del milisegundo. Sin embargo, otro campo donde últimamente los compuestos enjaulados cobraron gran utilidad es en el control (y el estudio del control) de la expresión génica.[40]

Normalmente los genes cuentan con zonas reguladoras, que sirven de unión a diversos factores (en general proteicos) que definen en tiempo y en espacio si el gen será expresado o no. Estos factores proteicos suelen cambiar su afinidad por la zona regulatoria según estén unidos o no a otras moléculas, que abarcan desde grandes complejos proteicos hasta moléculas pequeñas, como por ejemplo hormonas, pequeños péptidos, o incluso iones como Ca^{+2}. [41]

Una de las primeras técnicas utilizadas para comprender la función de un gen fue "romper" ese gen (hacer un *knock-out*) e intentar entender qué función faltaba en su ausencia. Pero muchos genes tienen distintos efectos en distintos estadíos de la vida del individuo, y desactivarlos al inicio del desarrollo no permite detectar sus efectos más tardíos.

Un refinamiento de la técnica del *knock-out* que aprovecha esta interacción consiste en activar o desactivar la expresión de un gen en *una parte* de un sistema vivo, y/o en *un momento dado.* Para ello se recurre a construcciones transgénicas, "mudando" entre un organismo y otro ciertas zonas regulatorias completas, junto con

los factores proteicos asociados que las reconocen. A este método se lo llama "transgénesis inducible" porque las moléculas pequeñas que inducen la expresión del transgen regulado, como esteroides o antibióticos, son aplicadas externamente en el momento en que se desea que el organismo exprese el gen. Un ejemplo de esto en pez cebra transgénicos (*Danio rerio*) es la capacidad de inducir genes por ecdisona, una hormona de insectos para la cual los vertebrados no tenemos receptores.[42] Hay que destacar que la regulación lograda por esta técnica resulta ortogonal al resto del sistema regulatorio, puesto que el genoma del vertebrado era absolutamente insensible a la ecdisona que ahora regula únicamente la expresión del transgén, simultáneamente en todo el individuo. Esto soluciona en buena medida el problema de acotar en el tiempo la expresión de un gen.

Sin embargo, el problema de acotarlo "en el espacio" aún está en vías de ser resuelta: es deseable poder restringir en el espacio, además de en el tiempo la expresión del transgén. Por lo tanto la posibilidad de disponer de una versión enjaulada y fotoactivable de estas pequeñas moléculas inductoras, de modo de poder controlar la expresión del gen de interés usando luz, es muy atractiva, dado que la luz es controlable con excelente precisión temporal y espacial.

Una molécula pequeña, inductora de un conjunto de genes conocida ya hace muchos años es isopropiltiogalactosa (IPTG), inductora del operon lactosa. El operón lactosa es uno de tales sistemas genéticos (descripto originalmente en *E. coli* [43]) que ha sido trasladado y adaptado por ingeniería genética a otros organismos, tanto vertebrados [44] como insectos [45]. La comprensión de este mecanismo en 1960 y los estudios sobre la regulación de la expresión de genes, les valió el Premio Nobel en 1965 a Jacob, Monod y Lwoff.

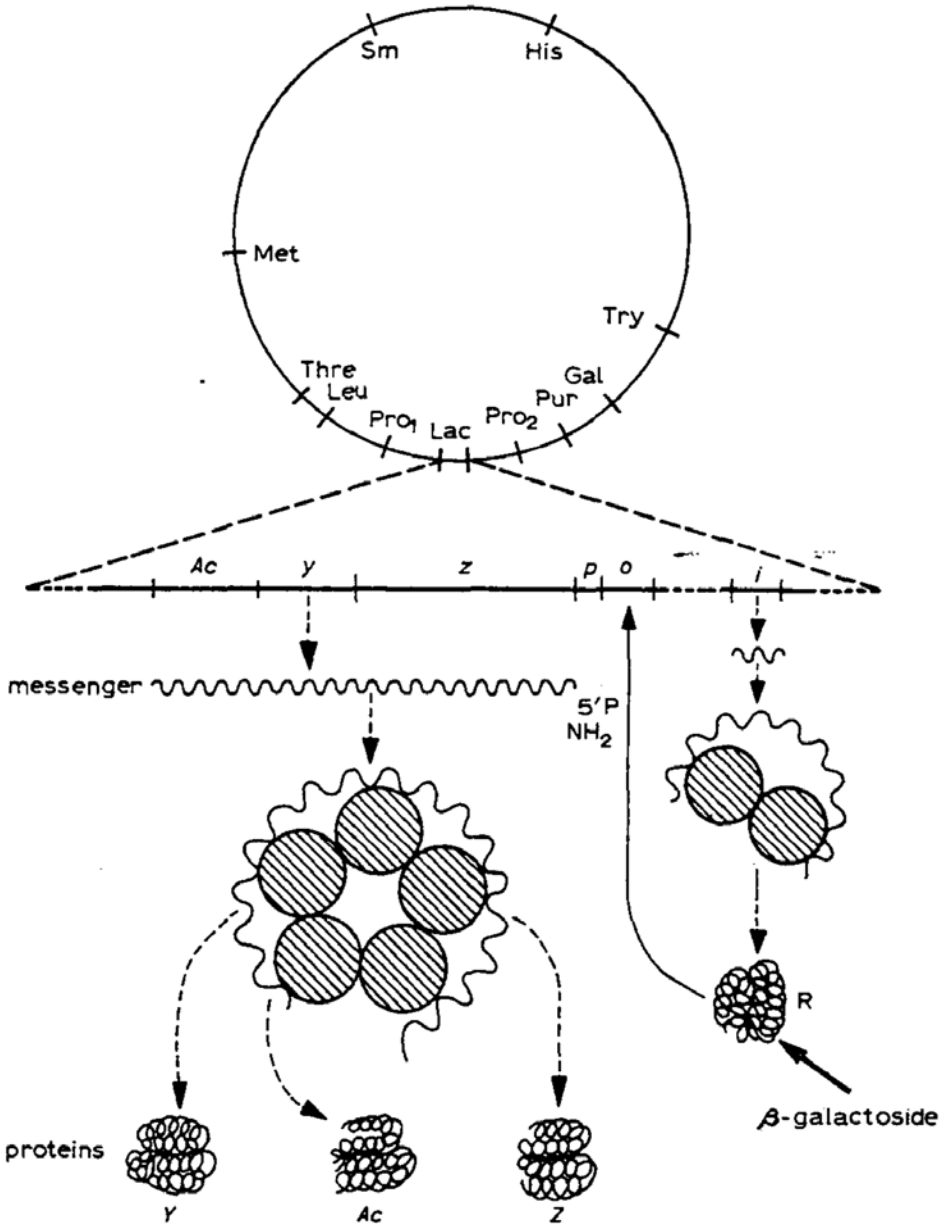


Figura 54: Tomada del original por F. Jacob, para su charla Nobel. (notar que la transcripción ocurre "*clockwise*" en esta convención). El círculo representa el cromosoma circular de *E. coli* con zona *lac* ampliada. Ac, y, z son proteínas de la vía metabólica de β-galactósidos. La proteína R impide la síntesis de la enzima β-Gal y el sistema se mantiene "reprimido". Los β-galactósidos se unen a la proteína R, impidíendole unirse al ADN (sitio O), y permitiendo así la síntesis de la enzima β-gal (Z) que es detectable por su reacción cromogénica con X-Gal.

La figura 54, ilustra los principales componentes del operón y su funcionamiento. El círculo grande representa el cromosoma de *E. coli*, y la zona ampliada ("Lac") es la secuencia de ADN llamada "operon lac". "messenger" indica ARN mensajero (ARNm, notar que en esta figura el ARNm se sintetiza de derecha a izquierda), y los discos oscuros representan polirribosomas que sintetizan proteína a partir de ARNm. Las secuencias codificantes para tres enzimas de la vía metabólica de la lactosa (β-galactosidasa (**Z**), transacetilasa (**Ac**), permeasa (**Y**)) se encuentran bajo el control de un sitio promotor (**P**) y un sitio operador (**O**). Una proteína regulatoria (**R**) tiene afinidad por el sitio **O** y está normalmente unida a éste impidiendo la transcripción de **Z**, **Ac**, e **Y**, pero pierde esta afinidad cuando está unida a β-galactósidos, como lactosa. Sólo si el sitio **O** está libre, es decir si la concentración de galactósidos es lo suficientemente alta como para titular casi completamente a la proteína **R** entonces las proteínas **Z**, **Ac**, e **Y** son sintetizadas. Este sistema simple evita que las proteínas que se necesitan para metabolizar galactósidos sean sintetizadas en ausencia de galactósidos.

Una de estas enzimas, la β–galactosidasa es en parte vertida al medio extracelular, donde puede detectarse con ensayos colorimétricos, ya que además de hidrolizar galactósidos a sus monómeros, la β-galactosidasa cataliza otras reacciones, por ejemplo la hidrólisis de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal) a galactosa y 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol, el cual dimeriza y se oxida espontáneamente a 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo que precipita en agua dando color azul indigo.[23]

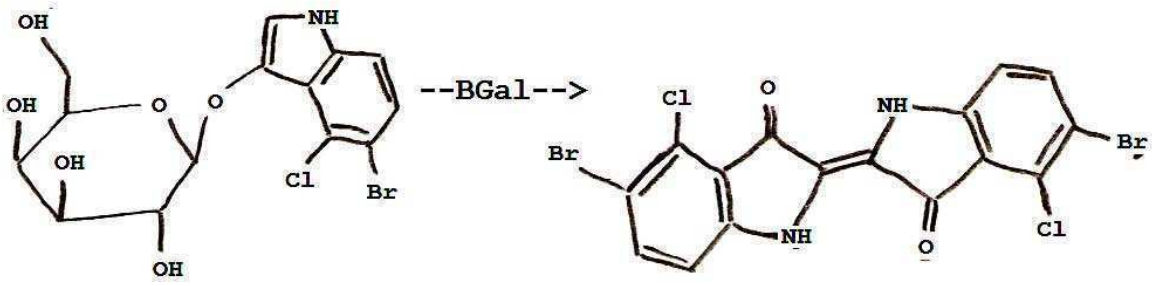


Figura 55: Hidrólisis de X-Gal por β-Galactosidasa a un indol que dimeriza a 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo, y precipita dando color azul.

Recapitulando, podemos inducir con una molécula pequeña exógena (IPTG) la expresión de una enzima (β-Gal). Esta enzima, con el sustrato adecuado (X-Gal) dá un precipitado azul, lo cual revela su actividad.

IPTG es, en principio, "enjaulable" porque es un tioéter que puede funcionar como base de Lewis y es capaz de coordinar al centro metálico. Sin embargo, como se verá más adelante, el impedimento estérico desplaza al equilibrio del lado de los reactivos y dificulta la síntesis del complejo de $[Ru(bpy)_2Cl(IPTG)]^{+2}$ por lo que se utilizó al análogo metiltiogalactosa (MTG) de similares características.

El tercer objetivo de esta tesis, por lo tanto, es demostrar que es posible inducir la expresión de un gen usando un inductor del operón lactosa enjaulado, e irradiando con luz visible para obtener el inductor libre. Usaremos para probar esta hipótesis el revelado de la actividad inducida de β-galactosidasa por su reacción con X-Gal y la aparición de precipitado azul en una población de células genéticamente homogéneas, como lo es un cultivo de *E. coli* a partir de una única colonia.

Materiales y Métodos.

Síntesis de $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(MTG)]^{+2}$

67 mg (100 µmol) $[Ru(bpy)_2(PMe_3)Cl]PF_6$ se suspenden en 3 ml de acetona y 2 ml de agua, y se calientan hasta disolución. Se repone la acetona evaporada con agua, manteniendo el volumen y evitando reprecipitación. Se agregan 100 mg (5 equivalentes) de MTG y la mezcla se calienta a 80 °C durante 5 hs, siguiendo la reacción por UV-Vis hasta la desaparición del acuocomplejo. Se enfría en agua helada y se precipita con exceso de $[BPh_4]^-$ en agua, se lo deja precipitando a 5 °C toda la noche. El precipitado amarillo se lava 5 veces en agua helada y se seca en desecador. Los espectros RMN se toman en un equipo Bruker de 500 MHz. La fotólisis del producto de reacción se lleva a cabo sin abrir ni retirar la muestra del tubo RMN, con una fuente de luz de longitud de onda conocida (520 ± 20 nm) , construída a tal fin.

Intercambio iónico.

Las sales de $[BPh4]^-$ ó $[PF_6]^-$ son poco solubles en agua y en las soluciones fisiológicas usadas en los bioensayos. Para realizar los bioensayos se intercambia $[BPh_4]^-$ por cloruro (Cl^-) del siguiente modo: En la oscuridad, el producto de síntesis se disuelve en una mínima cantidad (~ 1 ml) de acetona, y esta solución se agita durante unos minutos en una resina de intercambio aniónico previamente cargada con Cl^- proveniente de una solución de NaCl 1 M, según las recomendaciones del fabricante (Sigma Aldrich, DEAE-Sephadex A-25). Retirado el contraión precipitante, el complejo puede usarse inmediatamente o liofilizarse y guardarse por tiempo prolongado.

Cultivos y manipulación de *Escherichia coli*.

La cepa de *E. coli* utilizada fue donada gentilmente por la materia Introducción a la Biología Molecular y Celular (IBMyC) de esta Facultad. Se trata de una cepa Lac^+, $AmpR^+$, integrados en el cromosoma.

Del vial de bacterias obtenido, una alícuota fue sembrada en 20 ml de medio rico, líquido, con ampicilina crecida durante toda la noche a 37 °C en un agitador orbital de construcción propia. De este cultivo se seleccionaron colonias para los experimentos de expresión de β-Gal, y se guardaron alícuotas en glicerol estéril a -20 °C para ser utilizadas en nuestro laboratorio en el futuro. Se usaron condiciones de cultivo estándard para *E. coli*, tanto en medio líquido como medio sólido, mínimos y ricos, según se describe a continuación.

Llamamos "Medio M9" a un medio de cultivo con la composición mínima necesaria para permitir el crecimiento de *E. coli*. La fuente de carbono usada es glicerol, que no activa al operón Lac. La composición de M9 usada es:

MgSO4	0.6 g
NH4Cl	0.5 g
Na2HPO4	3 g
KH2PO4	1.5 g
NaCl	0.25 g
Glicerol	1 ml

en 1 L de agua mQ llevado a pH = 7.3

Además, llamaremos "medio LB" al medio de cultivo también conocido como "medio rico", que contiene vitaminas y aminoácidos. "LB" viene de *Lysis Broth*, (caldo de lisis) nombre dado por Giuseppe Bertani en 1951 al medio de cultivo que permitía a los bacteriófagos lisar las bacterias. [46]

Su composión es:

Bactotriptona	10 g
Extracto levadura	5 g
NaCl	10 g

En 1 litro de agua mQ, pH 7.3.

Para obtener medio LB sólido se agrega Bacto Agar, 15 g/l. Todos estos componentes fueron obtenidos de proveedores locales. Todo el material de cultivo utilizado, y los medios de cultivo, fueron esterilizados en autoclave.

Para determinar la mínima concentración de MTG capaz de inducir al operón lac en tiempo corto (~2 hs), se plaquearon seis concentraciones distintas de MTG: 100 µM, 300 µM, 1 mM, 3 mM, 10 mM, y control sin MTG. (figura 64, pág 101).

Para poder sembrar una gran cantidad de bacterias en un volmen reducido de medio de cultivo, pero evitando que el cultivo pase la fase de crecimiento logarítmico (lo que hace la inducción con MTG mucho menos probable), concentramos las bacterias antes de plaquearlas del siguiente modo: 7 ml de un cultivo de *E. coli* crecido toda la noche en medio mínimo M9 hasta una densidad óptica de 0.6 medido a 600nm (OD_{600} ~ 0.6), se centrifugan y el pellet se resuspende en 1 ml medio M9 líquido. Se las utiliza a la brevedad.

Los pasos que siguen se realizan bajo iluminación con longitud de onda > 600 nm. Se diluye este concentrado en un volumen igual de una solución de $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(MTG)]Cl$ 2 mM en H_2O ($[MTG]_{final}$=1mM), y con él se empapa un papel de filtro previamente impregnado en X-Gal. Se evapora el agua en exceso bajo un flujo de aire limpio y se deja este papel húmedo dentro de una placa de Petri protegida de la luz, sellado con Parafilm$^{(tm)}$, en la estufa húmeda a 37 °C.

Se probaron distintos métodos para impregnar el papel en medio de cultivo, tratando de obtener un resultado homogéneo. El papel de la figura 65 (pág.102) fue rociado con un aerógrafo. Los de la figura 66 (pág.103) fueron mojados con un pincel. El método que más homogéneamente cubrió la superficie (figura 67, pág. 105) fue aplicar el volúmen de medio necesario (~ 1 ml) en una gota sobre el fondo de la cápsula Petri vacía, y depositar y aplastar rápidamente el papel de filtro sobre esta gota, evitando burbujas.

La fuente de luz usada para inducir la expresión de β-Gal es un microproyector de bolsillo 3M (110 MPro) de < 10 lúmenes, cuya fuente de luz es un LED de alto brillo, adaptado con una lente levemente convergente para lograr una imágen del tamaño de una Petri stándard (9 cm) y no perder luz. El tiempo de irradiación es de 20 min. Se trabaja bajo luz roja. En la figura 56 se muestra la irradiación de una placa de Petri, en montaje vertical con el proyector, detrás de la laptop, conteniendo *E. coli*, X-Gal y MTG enjaulado. La geometría de la zona iluminada puede ser elegida caprichosamente por el investigador. En este caso la imágen proyectada reza "MTG".

Figura 56: Fotolisis de MTG enjaulado con un microproyector sobre un cultivo de *E. coli*

Revelado de la actividad enzimática

La actividad de la enzima β-galactosidasa fue revelada por catálisis de la hidrólisis de X-Gal. Rutinariamente, X-Gal es disuelto casi indistintamente en dimetilsulfóxido (DMSO) o en dimetilformamida (DMF) en los protocolos de preparación de medio de revelado de actividad β-galactosidasa. Sin embargo, es importante recalcar que el DMSO reacciona rápidamente con el $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(MTG)]^{+2}$, compuesto enjaulado de MTG, liberando el MTG coordinado y reemplazándolo por DMSO, aún en la oscuridad. Por lo tanto, para estos ensayos el revelador X-Gal fue siempre disuelto en DMF.

Sin embargo, el DMF ataca al poliestireno, material del que están hechas las cápsulas de Petri descartables que utilizamos. De modo que el método para aplicar X-Gal al sustrato de cultivo es: disolver X-Gal en una mínima cantidad de DMF (10mg/ml), y diluír esta solución en 10 volúmenes de metanol, a una concentración final de 1 mg/ml. Se deposita una gota en capsula de Petri y se moja el papel sobre ella. Se lo deja secar 5 minutos en la campana de flujo laminar. El papel resulta homogéneamente impregnado en X-Gal, conteniendo sólo trazas de metanol y muy poca DMF. Luego se aplica el medio de cultivo con bacterias, como fue descripto anteriormente.

Para crear patrones de iluminación, se usaron dos métodos:

Método manual: se usa un puntero láser de 405 nm, < 1mW para "dibujar" sobre el papel la figura que queremos obtener, como si fuera un lápiz. Este método es rápido y simple, pero es difícil regular la cantidad de luz que se aplica, puesto que depende de la velocidad del láser sobre el papel (~ 1 cm/s). Se agregó a la salida del

láser un lente convergente de unos 5 cm de distancia focal, de modo que el tamaño del haz sobre el papel puede regularse cambiando la distancia entre el láser y el papel.

Método de "proyección": se usa un microproyector comercial, marca 3M modelo Mpro 110 para proyectar una imágen generada por computadora sobre el sustrato de cultivo como fue descripto anteriormente. Este método estandariza la cantidad de luz entre réplicas del experimento. Como el flujo de luz del proyector está estabilizado, la cantidad de luz sólo depende del tiempo de exposición. Aunque siempre proyectamos imágenes "blancas", es decir con máxima transmitancia en todos los colores del LCD del proyector, la cantidad de luz por pixel, o su color son otros dos parámetros que podrían variarse para conseguir distintos grados de inducción.

Para seguir y documentar el desarrollo del precipitado azul, se quitó el proyector del pié y se montó una cámara de fotos digital de 12 MPixels. Para reducir al mínimo la fotólisis no deseada del compuesto enjaulado durante la inspección visual iluminamos con un LED rojo de alta corriente (610 ± 15 nm, 100 mA) alimentado por una fuente switching estabilizada. Esto nos permitió tomar las capsulas de la estufa periódicamente y seguir la aparición del precipitado visualmente con luz roja ó tomar fotografías del estado final con exposiciones largas y luz blanca tenue ó luz ambiente.

Resultados y discusión.

Síntesis de reguladores génicos con tioéteres enjaulados.

Como mencionáramos en "objetivos generales", la intención era incursionar en los complejos de coordinación de tioéteres con Ru-bpy, en particular con isopropiltiogalactosa (IPTG), pues es un regulador del sistema *lac*, con el objetivo final de controlar la expresión de un gen con luz, objetivo central de esta tesis.

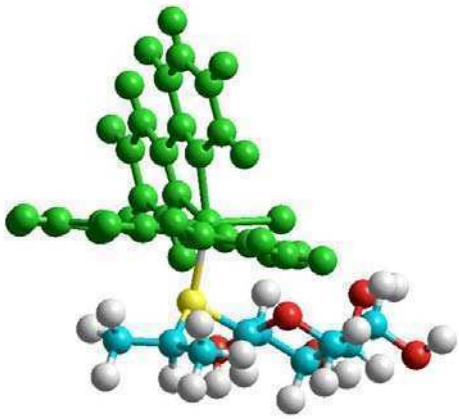


Figura 57: Modelo del complejo hipotético $[Ru(bpy)_2Cl(IPTG)]^+$. de tubos y esferas ($[Ru(bpy)_2Cl$]en verde, IPTG en colores IUPAC).

Aunque una simulación estructural rápida de $[Ru(bpy)_2Cl(IPTG)]^+$ (figura 57) no muestra un impedimento estérico demasiado importante, probablemente la voluminosidad del grupo isopropilo restringe las orientaciones efectivas de las colisiones moleculares que pueden formar un enlace de coordinación, dificultando la síntesis.

La figura 58 muestra el espectro de la mezcla de reacción de síntesis de este complejo, con una banda MLCT corrida hacia el azul respecto al $[Ru(bpy)_2Cl(H_2O)]^+$ en los 430~440 nm. En un tiempo de reacción relativamente corto (30 min, trazo rojo). El complejo es fotoactivo y tiene buena eficiencia cuántica, pues con una breve iluminación (trazo negro, "fotolisis") revierte en buena medida al espectro original.

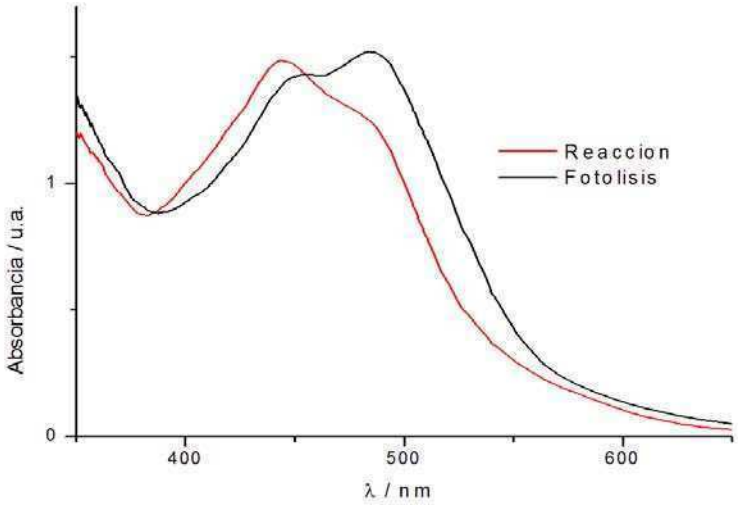


Figura 58: Espectro UV-Vis de la solución de síntesis de $[Ru(bpy)_2Cl(IPTG)]^+$ luego de 30 minutos de reacción y su fotólisis parcial.

Luego de 20 hs de reacción el equilibrio resulta bastante desplazado hacia productos (figura 59, trazo rojo) sin embargo al hacer la prueba de estabilidad, dejándolo 12 hs en solución en la oscuridad a 5 °C, el IPTG coordinado es desplazado por agua, y la reacción revierte al espectro original del acuocomplejo $[Ru(bpy)_2Cl(H_2O)]^+$ (figura 59, trazo azul, "Oscuridad"). Esto es completamente inconveniente, porque significa que el complejo liberará espontáneamente la molécula enjaulada y habrá poco contraste entre las concentraciones del enjaulado en zonas iluminadas versus no-iluminadas.

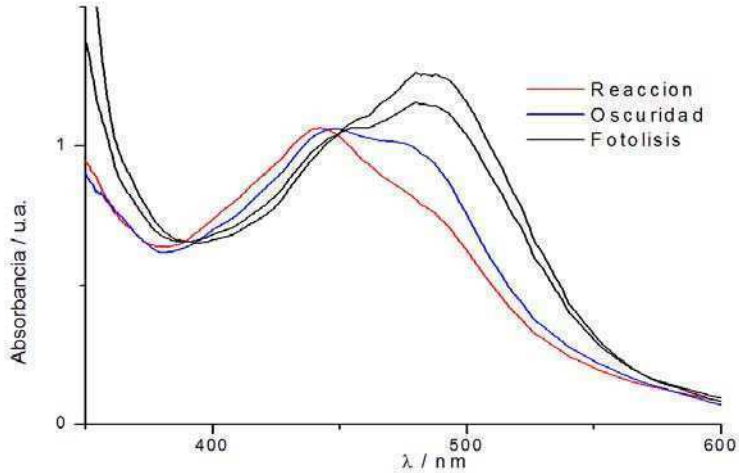


Figura 59: Espectro UV-Vis de la solución de síntesis de $[Ru(bpy)_2Cl(IPTG)]^+$ y sus fotólisis parciales.

Para distinguir entre un efecto estérico, y un efecto de basicidad de Lewis insuficiente, comparamos el comportamiento de IPTG con otros dos tioéteres de interés biológico: metionina y metiltiogalactosa (MTG, un análogo más pequeño de

IPTG en el que se reemplaza al isopropilo por un metilo). La metionina es mucho menos voluminosa que IPTG y es buen modelo de la unión de coordinación, mientras que MTG sólo difiere en el isopropilo, y modela mejor el posible impedimento estérico y la solubilidad de la hexosa.

Los tres complejos resultaron inestables en la oscuridad, lo cual favoreció la hipótesis de que el efecto electrodonor del tioéter es insuficiente para ese grupo protector $[Ru(bpy)_2Cl(L)]^+$, resultando en un complejo inestable, versus la hipótesis del impedimento estérico. Por otro lado, las reacciones de coordinación con metionina y con MTG progresan más rápidamente y alcanzan el equilibrio antes, y más desplazada hacia reactivos, que la de coordinación de IPTG, lo cual habla de una constante cinética mayor para ligandos más pequeños.

Tratándose de un ligando poco donor, buscamos la forma de aumentar la densidad electrónica sobre el Ru de modo de estabilizar este enlace de coordinación. Para ello sintetizamos complejos con los siguientes ligandos moduladores en la 5^{ta} posición: Cl^- , I^-, Br^-, H_2O, NH_3, Azida, PPh_2Me, $PPhMe_2$, PMe_3. (donde PPh_n = fenilfosfinas y PMe_n = metilfosfinas)

Sólo como ejemplo, se muestra el comportamiento del complejo $[Ru(bpy)_2(azida)(IPTG)]^+$. A las 48 hs la reacción aún no ha llegado al equilibrio, y la eficiencia cuántica de fotólisis estimada en la mezcla cruda de reacción no es especialmente buena (figura 60).

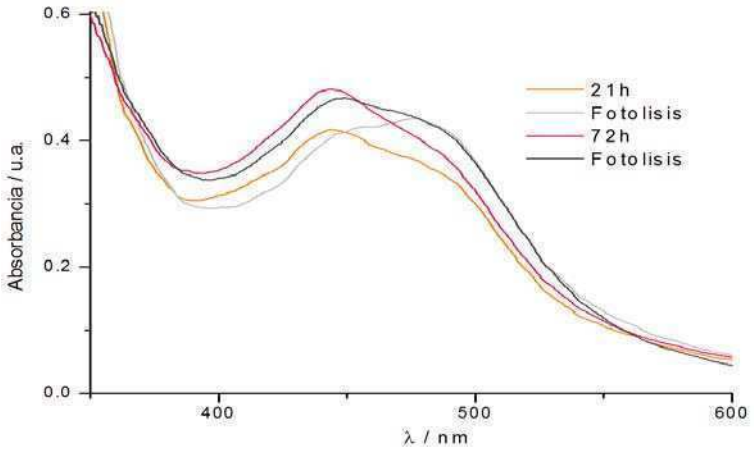


Figura 60: Espectro UV-Vis de la solución de síntesis de $[Ru(bpy)_2(azida)(IPTG)]^+$ a las 21 hs y 72hs de reacción y su fotólisis parcial.

Los mejores resultados se obtuvieron con fosfinas donoras en la 5ta posición. Éstas resultan en complejos con bandas MLCT alrededor de 420 nm, con buena eficiencia cuántica de fotólisis y con buena estabilidad del ligando modulador. Entre las fosfinas, la de mejor biocompatibilidad [39] y mayor basicidad es trimetilfosfina (PMe_3). Adoptamos pues este ligando modulador para nuestros complejos de tioéteres. La figura 61 muestra los espectros UV-Vis del producto purificado de la síntesis de un enjaulado de metionina, en condiciones ácidas (trazo negro), básicas (rojo) y fotolizado (azul).

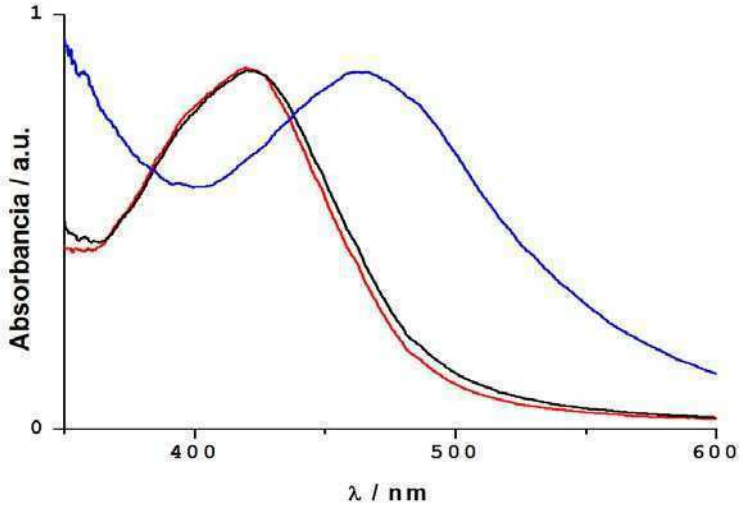


Figura 61: Espectro UV-Vis del producto de síntesis de $[Ru(bpy)_2(PMe)_3Metionina]^{+2}$ a pH=6 (rojo) y pH=11 (negro), y su producto de su fotólisis en medio básico (azul). Abs_{max}= 421 nm.

Como mencináramos antes, encontramos que la metiltiogalactosa (MTG), un análogo de IPTG, alcanza el equilibrio en la reacción de coordinación notablemente

más rápido. MTG es prácticamente tan efectivo al inducir operón *lac* como IPTG, de modo que decidimos centrar nuestra atención en $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(MTG)]^{+2}$. La figura 62 muestra un espectro de este fotoliberador de MTG, y los espectros de su fotólisis en la cubeta de espectrofotometría, con un LED azul de 100 mA encendido durante 1, 2, 7, y 60 segundos, en agua a pH ~6.

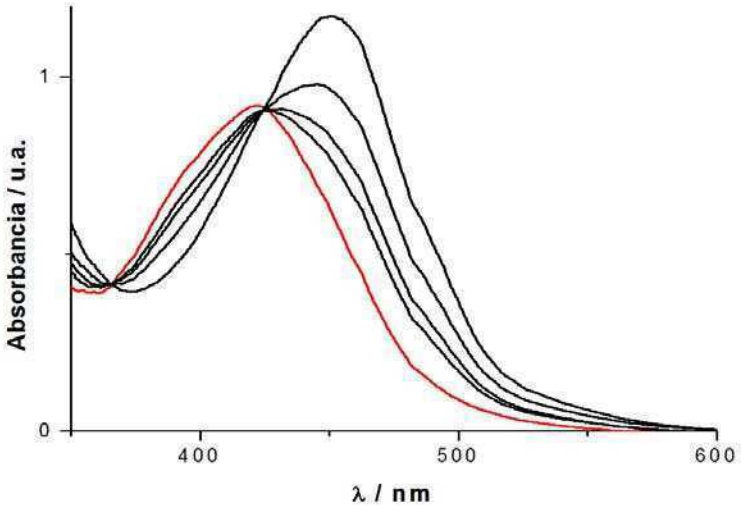


Figura 62: Espectro UV-Vis de $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(MTG)]^{+2}$ (rojo) y espectros de su fotólisis a distintos tiempos (1 s, 2 s, 7 s, y 60 s) y siempre a pH ~6. Abs_{max}=422 nm.

La reacción de fotólisis también fue seguida por RMN. La figura 63 muestra la zona alifática correspondiente al complejo $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(MTG)]^{+2}$ sintetizado (arriba, trazo negro), al de su producto de fotólisis después de irradiar con luz verde de 520 nm +- 20 nm (al medio, rojo), y el espectro de MTG libre sin modificar, utilizado como patrón (abajo, verde). El complejo de partida $[Ru(bpy)_2(PMe_3)acuo]^{+2}$, que se utiliza para la sintesis, es una mezcla de los enantiomeros Δ y Λ [16]. Al formarse el complejo conteniendo MTG, el cual es la forma D enantioméricamente pura, se obtiene una mezcla de los dos diasterómeros correspondientes: Δ-D y Λ-D. Esto es claramente visible en el espectro de RMN, en el cual las señales aparecen duplicadas, especialmente aquellas que corresponden a protones cercanos al punto de coordinación (señales (1) y (2)).

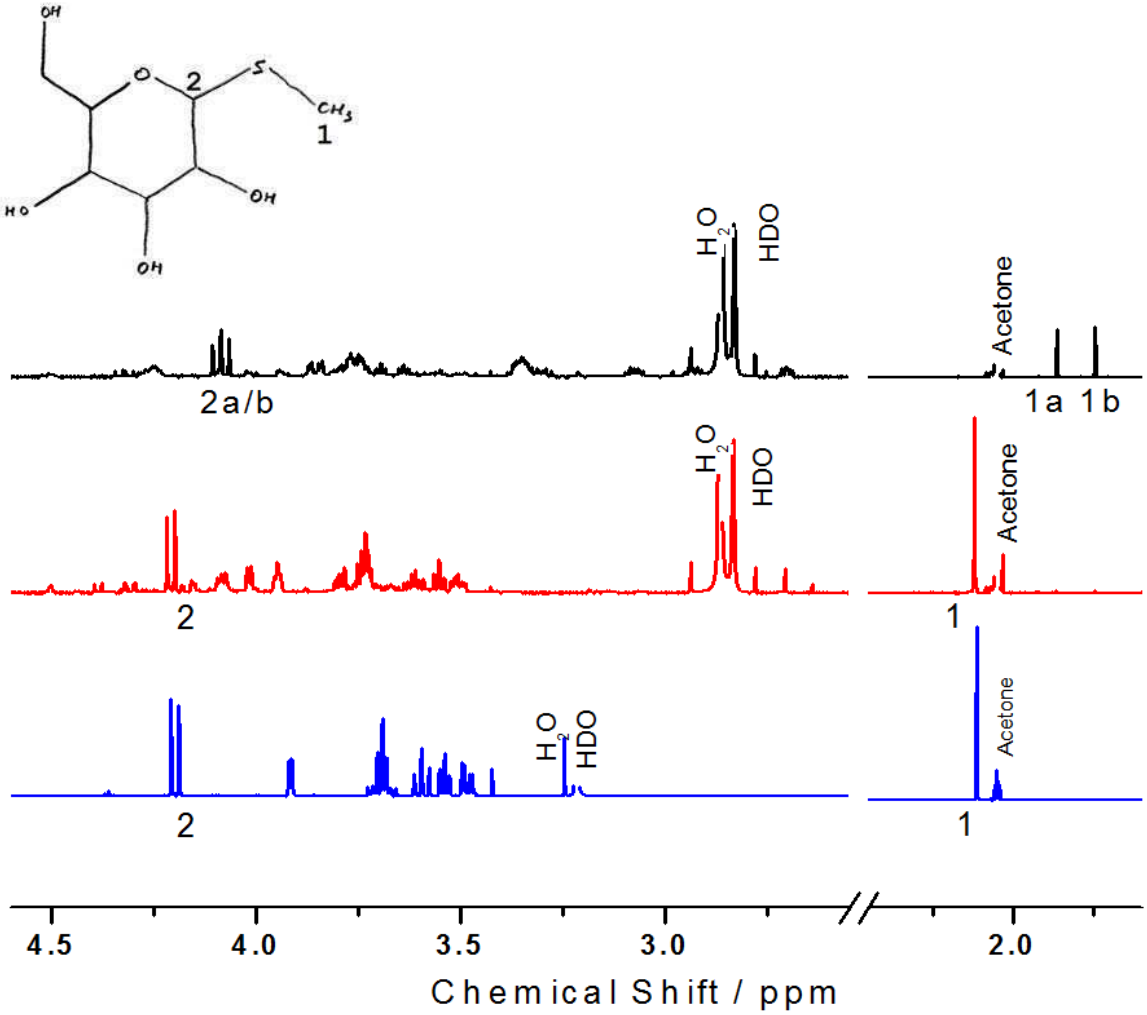


Figura 63: Espectro RMN del complejo $[Ru(bpy)_2(PMe_3)MTG]^{+2}$ en acetona (arriba, negro) su producto de fotólisis prácticamente total tentro del tubo RMN (medio, rojo) y un espectro de MTG intacto (abajo, verde). Las señales por debajo de 2.5 ppm se representan multiplicadas por ¼.

El par de señales que más difieren entre sí, y que más cambios sufren al coordinarse son los dos singuletes a 1.87 y 1.74 ppm, que corresponden al metilo unido al azufre coordinante, para ambos diasteromeros. Luego de la fotólisis aparece la señal única a 2.12 ppm, que corresponde al metilo del MTG libre. Esto se corrobora por comparación con el espectro del MTG patrón. Agregar MTG al tubo irradiado solamente aumenta la integración de dicha señal, sin aparecer nuevas señales en el entorno. El siguiente pico que más cambia es el que corresponde al hidrógeno del carbono anomérico, también a un solo enlace de distancia del azufre. Esta señal, un

doblete en el MTG libre que aparece a 4.21 ppm, pasa a ser dos dobletes superpuestos en 4.12 y 4.14 ppm en el MTG enjaulado (señal (2)). En el espectro irradiado puede verse que la totalidad de las señales que corresponden al MTG aparecen claramente. Algunas señales adicionales que también aparecen con menor integración pueden deberse a productos de fotólisis en los que parte del MTG queda coordinado a Ru. Por medio de este experimento queda determinado que no existe MTG libre en cantidad apreciable en el MTG enjaulado, y que aparece inequívocamente después de la fotólisis, aún utilizando luz de muy baja energía. En la zona aromática del espectro (no mostrada), ademas de las 3 señales correspondientes a los protones del tetrafenilborato, se ve la presencia de los picos correspondientes a las bipiridinas, a razon de 8 por bipiridina para cada uno de los 2 diasterómeros. Una vez fotolizado, el número de señales disminuye ya que los enantiomeros Δ y Λ $[Ru(bpy)_2(PMe_3)acuo]^{+2}$ producen el mismo espectro. La profusión de señales en esta zona no es adecuada para un analisis mas detallado, que no tiene ademas importancia en este caso.

Estos resultados (RMN y UV-Vis) demuestran que el MTG efectivamente coordina por azufre y que el complejo es fotolábil. Como resultado colateral, aunque no menos importante, sintetizamos un fotoliberador de metionina coordinado por el azufre, dejando los extremos amino y carboxilo libres para participar en uniones peptídicas.

Una vez sintetizado el fotoliberador de MTG, el objetivo siguiente es realizar los bioensayos correspondientes.

Bioensayos. Regulación de genes con luz.

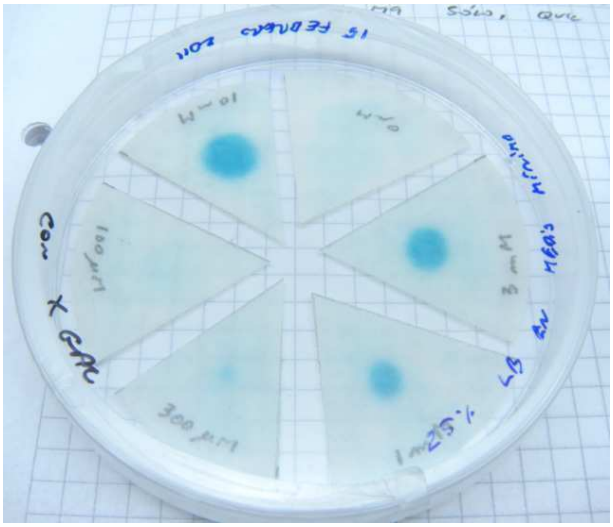


Figura 64: Ensayo de inducción del operon *lac* a distintas concentraciones de MTG (libre) revelado por reacción con X-Gal.

El objetivo de los bioensayos es confirmar algunas de las hipótesis planteadas sobre la bioactividad del MTG enjaulado; es decir que en la oscuridad el compuesto no tenga actividad biológica, que una vez fotoliberado active el gen elegido y que tenga buena biocompatibilidad. Los bioensayos utilizaron al operón *lac* de *Escherichia coli*. , una especie que normalmente no responde a la luz expresando β-Gal.

Para evitar cultivar individuos cuya expresión de β-galactosidada fuera siempre positiva (constitutiva) o siempre negativa (no inducible) se sembró en baja concentración la cepa recibida para obtener colonias aisladas. Se hicieron repiques en dos placas diferentes, una con y la otra sin inductor (MTG), ambos con X-Gal. Para los bioensayos utilizamos únicamente aquellas colonias cuya actividad β-Gal fuera inducible.

La mínima concentración de MTG que induce al operón Lac y nos da un precipitado visible en ~2 a 4 hs está entre 300 µM y 1 mM (fig. 64). Se hizo un control negativo irradiando los cultivos con nuestras fuentes de luz para confirmar que la luz por sí misma (un puntero láser de 405 nm, < 1 mW) no fuera inductora del operón, ni ocasionara la aparición de precipitado azul.

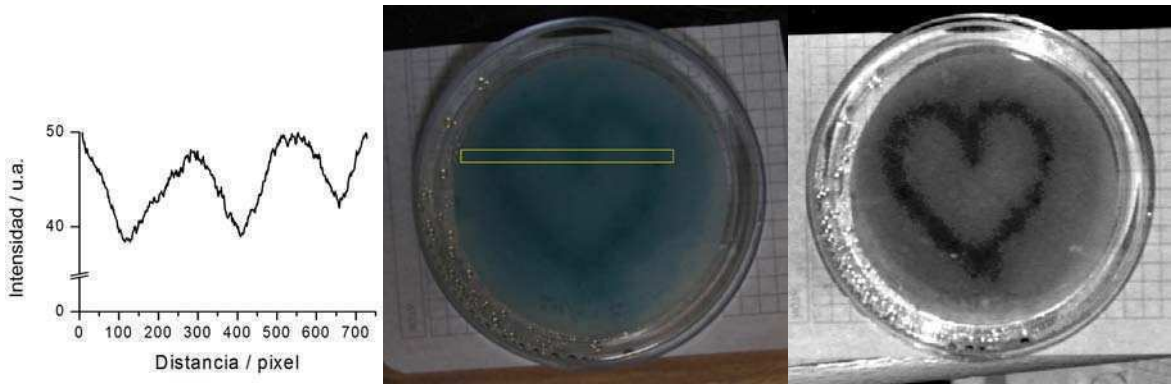


Figura 65: Inducción del operon *lac* con un puntero láser de 405 nm. El papel fue rociado con aerógrafo con la solución de *E. coli*, X-Ggal y MTG enjaulado. El dibujo fue trazado a mano a una velocidad de ~1 cm s^{-1}. Centro: Fotografía sin procesamiento. Derecha: Contraste aumentado. Izquierda: cuantificación de luminancia para la zona destacada en la fotografía (menor intensidad = más precipitado azul, la diferencia máxima es de 1/5 de la intensidad máxima de color).

Una vez puestas a punto las condiciones, fue posible inducir la expresión de actividad β-Galactosidasa en zonas previamente definidas de la placa de Petri. Utilizando un puntero láser, se "dibujó" a mano un corazón sobre uno de los sustratos (era 14 de febrero). Al cabo de 30 minutos a 37 °C el patrón iluminado comienza a reflejarse en una coloración azul en el papel, que adquiere el máximo contraste entre las 2 y las 4 hs de cultivo (figura 65).

Para minimizar la cantidad de MTG enjaulado utilizada, y para lograr concentraciones homogéneas de X-Gal y de inductor en el sustrato de crecimiento de *E. coli*, las bacterias fueron crecidas sobre papel de filtro de tipo Whatman según se describe en Materiales & Métodos. Brevemente, se impregna al papel de filtro en X-Gal y luego en un concentrado de *E. coli* en LB líquido con MTG enjaulado. Se usó el complejo $[Ru(bpy)_2(PMe_3)MTG]Cl_2$.

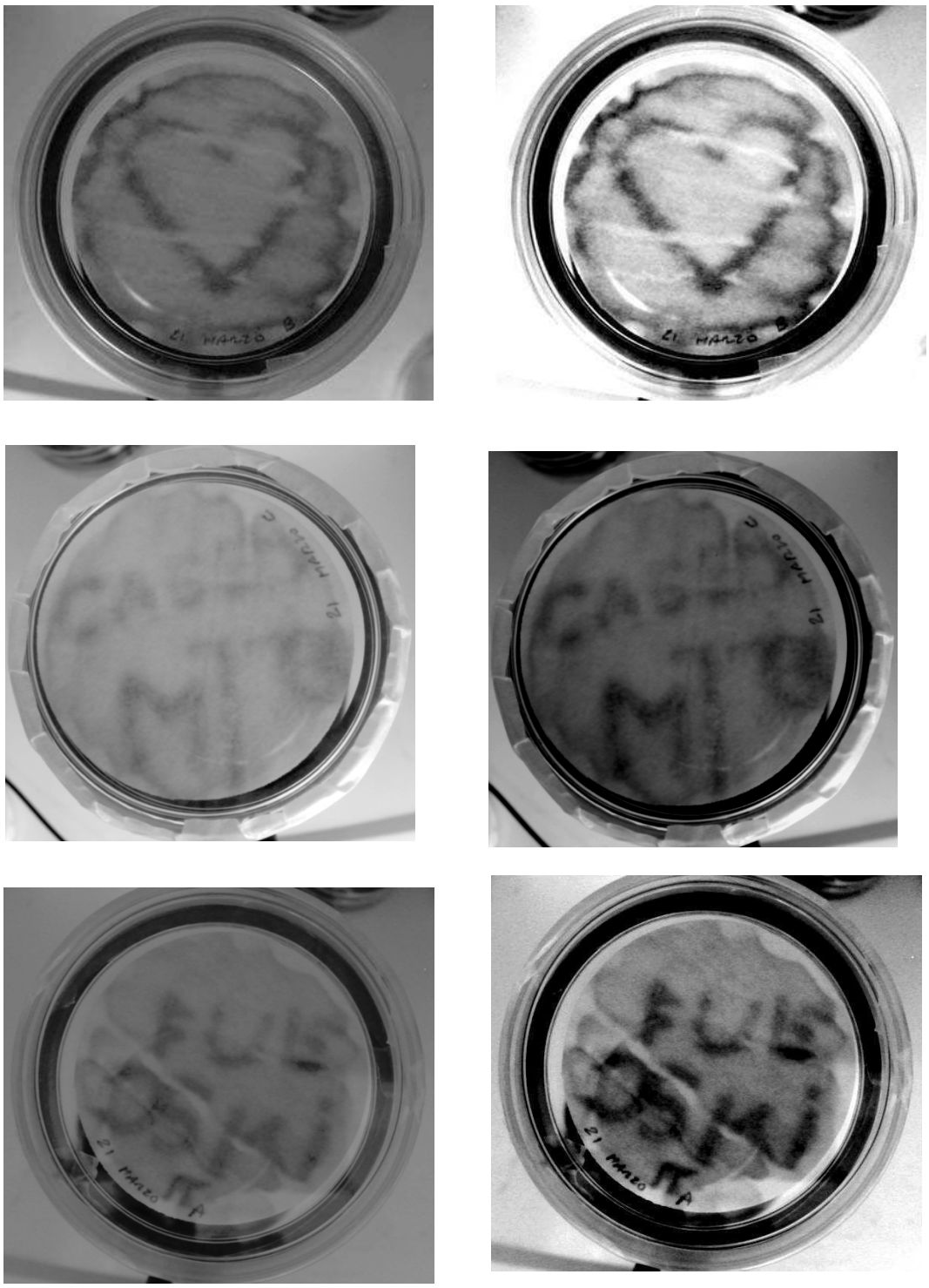


Figura 66: Inducción del operon *lac* con un puntero láser de 405 nm. El dibujo fue trazado a mano a una velocidad de ~1 cm s^{-1} . Revelado por reacción con X-Gal presente en el sustrato. Derecha: Imagenes con contraste mejorado digitalmente. Diametro del papel = 7 cm. Los patrones son: un corazón, "caged MTG", "fue Oski".

Por último, una vez que el sustrato de cultivo es expuesto a la luz, cualquier movimiento del medio de cultivo deformará la imágen proyectada, la cual en este estado es sólo un escalón en el perfil de concentración de MTG libre. Para evitar esto se hicieron los bioensayos en papeles húmedos, con una cantidad mínima de agua, evitando corrientes por evaporación, y se redujeron los movimientos tanto como fue posible. Después de exponer a la luz con la imágen deseada, se protegió la cápsula de la luz y se dejó en la estufa a 37 °C hasta la aparición de color. Los papeles de las figuras 65, 66, y 67 fueron mojados por distintos métodos (ver Mat. & Met.) lo cual explica las diferencias en la actividad basal de β-Galactosidasa observadas.

En la figura 66 es visible el patrón de depósito inhomogéneo de X-Gal y medio de cultivo (se usó un pincel e irradiación manual). Esto fue mejorado en experimentos subsiguientes. Para automatizar la irradiación, usamos un microproyector VGA conectado a un programa que presenta imágenes. Se muestra en la figura 67 una serie de imágenes proyectadas y los patrones de expresión de β-galactosidasa obtenidos.

Estos ensayos en conjunto muestran que es posible manipular la expresión de genes regulando la cantidad de luz que se libera sobre un cultivo de *E.coli*. Dado que se trata de células que originalmente son genéticamente equivalentes, por provenir de una única colonia que desciende de un único individuo, es notable la capacidad de inducir *algunas* células a expresar una proteína, y no a sus vecinas.

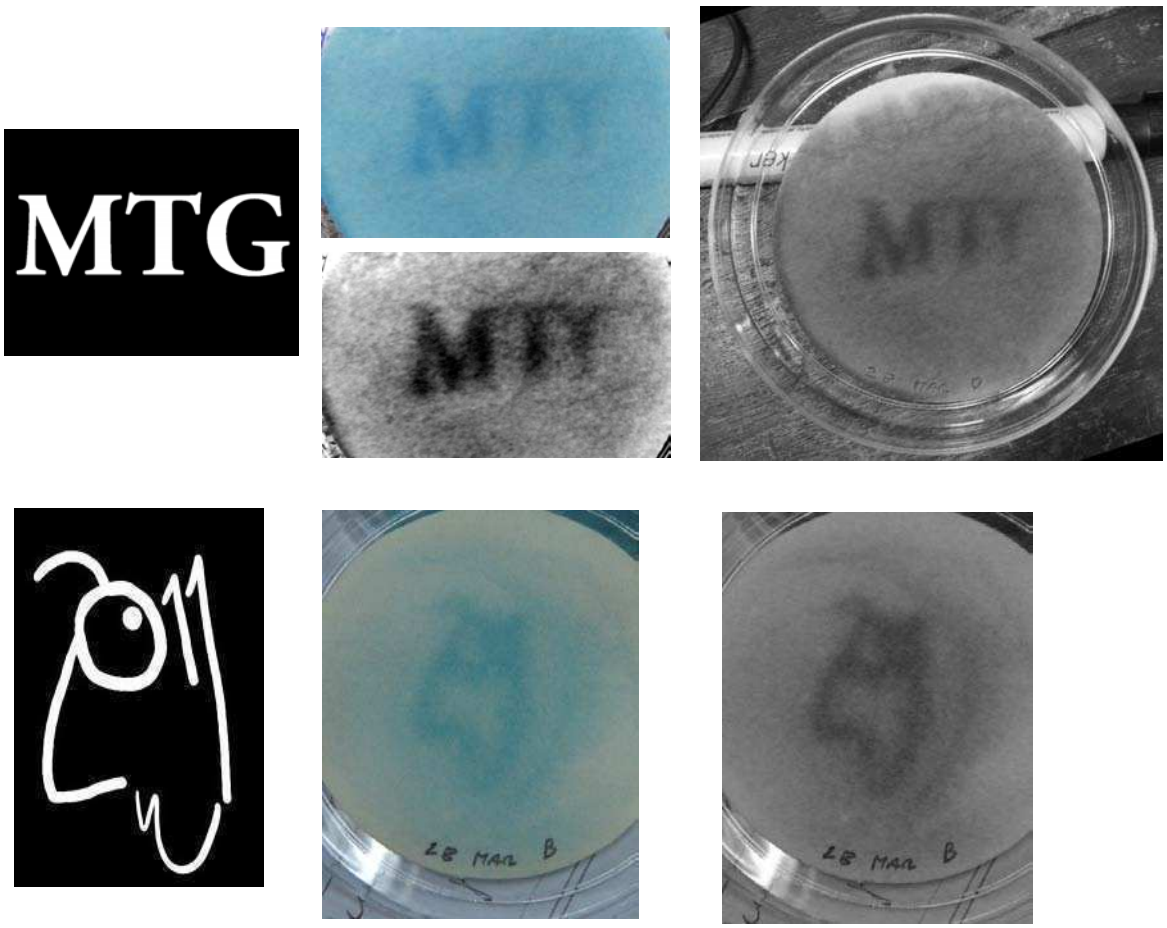


Figura 67: Inducción del operon *lac* con un microproyector de bolsillo, cuya fuente de luz es un LED "blanco" de 3W. Izquierda.: imágen proyectada. Centro: Fotografía de los papeles de cultivo, sin procesamiento alguno (azules) y con aumento de contraste (gris, MTG). Derecha.: Imágenes grises corresponden sólo al canal "rojo" de la cámara, sin procesamiento alguno.

Como conlusiones inmediatas de esta serie de experimentos podemos decir que:

La concentración de compuesto enjaulado fue bien elegida, siguiendo el mismo criterio que se usó para elegir las concentraciones de los neurotransmisores enjaulados en los bioensayos con sistema nervioso de *H. medicinalis*. Evitamos la inducción de la expresión de β-Gal en ausencia de luz. La concentracion de MTG libre posiblemente presente en la solución final de compuesto enjaulado aplicada resulta

subumbral para las bacterias. Al aplicar una cantidad de luz importante desenjaulamos suficiente MTG como para que su concentración suba por encima de los niveles requeridos para inducir la expresión del gen.

Aunque pueden apreciarse distintas intensidades de precipitado azul, a nivel individuo, el sistema *lac* es prácticamente binario puesto que funciona con un factor de amplificación muy grande: la proteína R está en bajo número de copias y es suficiente con pocas moléculas del inductor para desrreprimir momentáneamente al sistema *lac* y sintetizar unas pocas moléculas de ARNm, que producirán cientos de copias de la enzima β-Gal funcional, la cual catalizará miles de eventos de hidrólisis que darán precipitado indigo detectable visualmente.

En estos bioensayos el evento de iluminación tiene consecuencias irreversibles sobre el sistema porque el MTG liberado no es degradado por las bacterias y mantendrá al operon desrreprimido. Hay otras formas de conseguir esto, o de lograr una expresión temporaria de las proteínas reguladas. Se puede, por ejemplo, inducir la expresión de la recombinasa Cre, y utilizar el ya conocido sistema Cre-lox para inducir la edición del genoma.[47] Otro método es controlar la expresión de un factor de transcripción de "alta jerarquía" por el sistema regulador *lac*, efectivamente regulando un conjunto de factores de transcripción que definan el destino celular.[48]

Un método aún más atractivo, debido al patrón de diferenciación resultante, es aprovechar sistemas de inhibición mutua como lo son Delta y Notch en Drosophila [38]. De este modo, al inducir un grupo de células con luz, las células no inducidas que están en contacto con ellas toman el "camino complementario" y se diferencian en otro tipo celular. Si se prefiere, por el contrario, una inducción temporaria, es posible usar un inductor hidrolizable.

Las posibilidades en bioingeniería son infinitas.

Conclusiones Generales

En este trabajo se cubrieron desde distintos ángulos las necesidades fundamentales para controlar la expresión de genes con luz: en al Capítulo 1, se demostró que es posible usar grupos protectores fotorremovibles basados en Ru-bpy para proteger moléculas tapizando una superficie, y desprotegerlas en patrones particulares con sólo iluminarlas. Sobre estas superficies se pueden crecer células. Además se diseñó un instrumento que permite modificar la composición molecular de dicha superficie. En el Capítulo 2 se demostró la capacidad para proteger grupos nitrilo de importancia farmacológica y biológica con una variedad de grupos protectores y se demostró la posibilidad de sintonizar la longitud de onda de máxima absorbancia mediante cromóforos coordinados. En el capítulo 3 demostramos que nuestro fotoliberador de MTG es efectivo para definir qué células expresarán un gen predeterminado.

Es importante notar que el complejo RuBiMAPN sigue la correlación observada entre posición de la banda MLCT y la eficiencia cuántica de fotoliberación por Pinnick y Durham. El complejo RuBiRhod, sin embargo debido al efecto antenna, mantiene una eficiencia de 0.07 a 532 nm, demostrando que este método es efectivo para aumentar la eficiencia cuántica. (Ver tabla 2 y figura 68).

Ligando X	Ligando Y	$\lambda_{máx}$	$\varphi_{fotolisis}$	En fig 68
piridina	Cl	505	0.04	a
4-acetilpiridina	Cl	495	0.07	b
CH_3CN	Cl	481	0.12	c
piridina	piridina	454	0.2	d
4-acetilpiridina	4-acetilpiridina	442	0.29	e
3-iodopiridina	3-iodopiridina	442	0.24	f
CH_3CN	CH3CN	426	0.31	g
Cl	MAPN	469	0.14	h
Cl	RhodMAPN	532*	0.07	RuBiRhod*
PMe_3	butenonitrilo	416	0.34	i
PMe_3	cianofenol	412	0.36	j
PPh_3	cianofenol	399	0.40	k
PPh_3	butenonitrilo	402	0.39	l
4-metilpiridina	benzonitrilo	430	0.29	m
4-metilpiridina	cianofenol	430	0.28	n
4-metilpiridina	butenonitrilo	435	0.28	o
PMe_3	MTG	422	0.30	p
PMe_3	metionina	422	0.32	q
N-metilimidazol	N-metilimidazol	483	0.001	r
imidazol	imidazol	488	0.001	s

Tabla 2. λ de máxima absorbancia y rendimientos cuánticos de fotólisis para los compuestos estudiados y otros tomados de literatura [11]. (*) RuBiRhod listado según la λ de excitación utilizada (532 nm), no la λ de su MLCT.

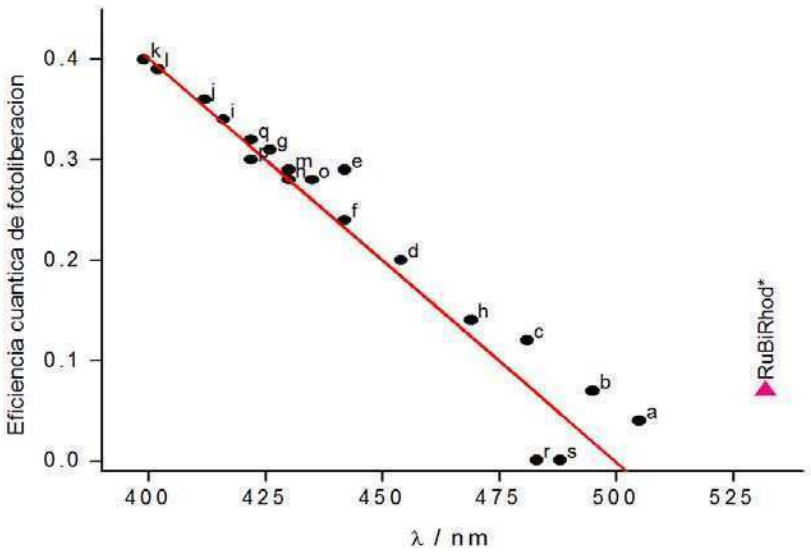


Figura 68: Correlación entre eficiencia cuántica y posición de la banda MLCT para el tipo de compuestos aquí estudiados. Linea roja: correlación observada por Pinnick y Durham (*) RuBiRhod está graficado según la λ de excitación utilizada (532 nm), no la λ de su MLCT.

La capacidad de enjaular nitrilos tioéteres y otros grupos poco dadores tiene consecuencias importantes en investigación biológica. La más evidente es la capacidad de sintetizar versiones "enjauladas" de los fármacos que muestran efectividad, para poder controlar con precisión subcelular el sitio y momento de su

aplicación. Esto permitiría comprender mejor sus interacciones y rediseñarlos de modo de minimizar los efectos secundarios o aumentar su afinidad.

Otra consecuencia del enjaulado de grupos nitrilo es la posibilidad de proteger aminoácidos no-naturales. Un ejemplo de ellos es el aminoácido fluorescente p-cianofenilalanina, [49] una fenilalanina modificada en posición *para* del anillo aromático con un nitrilo de modo que, además de ser fluorescente, es un aminoácido enjaulable por su cadena lateral. Esta combinación de propiedades lo hacen muy útil por ejemplo, en el seguimiento de la reacción de *folding.* La idea es mantener a la proteína que incorpore cianofenilalanina en un estado no-plegado hasta fotorremover el grupo protector, liberándola luego con cinética muy precisa para permitirle "caer" en su plegamiento de mínima energía y estudiar el proceso. La constante de tiempo ($\sim$ 10 ns) de la reacción de fotoliberación es mucho menor que la de la mayoría de los grupos protectores orgánicos, que rondan los µs ó incluso los ms, y no interferirá con la reacción de plegado, que no suele ser más rápida que 1 µs. Existen antecedentes de otros aminoácidos modificados con fluoróforos como coumarina y dansilo [35, 36] que han sido exitosamente incorporados a proteínas por síntesis *in vivo*.

Como aplicación específica, proponemos aprovechar la existencia de cianodoxiciclina (CNDCC) como regulador de la expresión de genes. La cianodoxiciclina fue derivada de la doxyciclina, un antibiótico de la familia de las tetraciclinas que ya se usaba (en el sistema "Tet-on") para inducir la expresión de genes por agregado de un fármaco.[50] Esta versión enjaulada de CNDCC (DMNPE-CNDCC) presenta una actividad 20 veces menor que CNDCC. Hipotetizamos que la protección de CNDCC por coordinación de su nitrilo a un centro Ru-bpy debería disminuír su actividad en al menos esa cantidad (o más, considerando el mayor

impedimento estérico debido al sistema Ru-bpy), resultando en una molécula fotoactivable de regulación génica ortogonal al MTG enjaulado. Hasta el momento, no existen (a mi entender) otros grupos protectores fotorremovibles para nitrilos.

La capacidad de expresar un gen en un conjunto de células con una geometría que no dependa de promotores específicos preexistentes está en el camino de la síntesis artificial de órganos, la ingeniería de tejidos, y la investigación en biología del desarrollo. Dado que, usando métodos de ingeniería genética, podemos supeditar la expresión de cualquier proteína al control de la zona regulatoria del operón lactosa, esta herramienta combinada de inductor enjaulado y su correspondiente construcción génica nos permitiría (en el mejor de los escenarios) expresar cualquier gen, en cualquier célula, sin depender de su genética previa. Esto permitiría (como un ejemplo hipotético) inducir la diferenciación de hueso con cualquier geometría que se desee (3D) por excitación en dos fotones, a partir de células transfectadas y desdiferenciadas. O tapizar un órgano simple creado por una impresora de órganos, como una aorta[51], de los tipos celulares que requiere para integrarse a la fisiología del paciente: endotelio, músculo liso, fibroblastos, etc, todas ellas diferenciadas del mismo conjunto de stem cells extraídas del paciente.

Por último, y para integrar conocimientos adquiridos y técnicas desarrolladas en este trabajo, La pequeña variedad de inductores génicos fotoactivables disponibles, junto con la capacidad de modular sus longitudes de onda de máxima sensibilidad usando el efecto antena descripto nos permite sugerir experimentos de activación ortogonal de genes, irradiando a diferentes longitudes de onda. Para ello se requiere una construcción génica en la cual diferentes genes se encuentren bajo la

zona regulatoria de *lac* y de *tet* (u otros reguladores) de modo de poder activar uno o el otro independientemente utilizando enjaulados ortogonales de MTG y de CNDCC.

La ocasión es adecuada para mencionar que se están desarrollando otros métodos de controlar la expresión de genes con luz, en algunos casos sumamente complicados. Un sistema recientemente publicado en Science [34] se basa en transfectar las células con un vector con el gen de interés y el gen de Melanopsina. Después de 1 ó 2 horas de exposición a la luz, Melanopsina (que contiene un grupo retinal) activa una proteína G, la cual activa a fosfolipasa C, que activa a proteín kinasa C, que aumenta la concentración intracelular de Ca^{+2}, la cual es sensada por calmodulina, quien activa a calcineurina que fosforila a NFAT, que transloca a núcleo activando (finalmente!) la expresión del transgén de interés. La ventaja de un sistema como este es que está totalmente "*genetically encoded*" es decir: después de lograr el transgén, ya no requiere aportes de moléculas externas. Sin embargo la enorme diversidad de rutas metabólicas alteradas es un obstáculo para su pronta aplicación clínica. Siempre existe el riesgo de activar directa o indirectamente alguna vía de proliferación celular y generar un tumor. La probabilidad, en nuetro sistema, de que eso ocurra es tan baja como para cualquier otro transgénico.

Una ventaja nada despreciable en el desarrollo de grupos protectores es el costo del equipo necesario para la fotoliberación. El precio de un objetivo de microscopio que transmite luz UV cercano, tomando como ejemplo el modelo de ThorLabs LMU-20X-NUV, 325 - 500 nm, NA=0.40 es de USD 2,136.90 mientras un objetivo similar Olympus para luz visible sólo cuesta USD 472.00. La transmitancia de cada elemento de vidrio cae por debajo del 80% más allá de los ~400 nm, y por debajo del 50%

después de los ~350 nm. La forma de evitar este problema es usar óptica de cuarzo, o rediseñar todo el sistema en base a reflexiones. A esto hay que agregar el precio de las fuentes de luz UV (preferiblemente lásers), cuyos costos son órdenes de magnitud superior a los láseres IR o visibles de 405 nm, 450 nm, 532 nm ó 580 nm, que son vendidos como punteros por decenas de dólares. Se puede decir que el banco óptico para irradiación automatizada construido en el Max Planck fue posible gracias a la sensibilidad a la luz visible de los grupos protectores utilizados.

Si bien es cierto que la luz ultravioleta, en particular la ultravioleta cercana (UV-A) tiene efectos sobre el ADN y las proteínas, esto no representaba un problema realmente serio mientras la tecnología de compuestos enjaulados era casi exclusivamente aplicada a la liberación de moléculas neuroactivas. Los efectos inducidos por los neurotransmisores y neuromoduladores a nivel celular se producen en un rango de tiempo entre milisegundos y minutos. Por lo tanto cualquier efecto sobre el ADN, aún cuando se activen sistemas de reparación de daño que requieren la expresión de nuevas proteínas, tendrían una cinética mucho más lenta y no deberían interferir con los efectos estudiados.

Al usar los enjaulados para modificar la expresión de genes, los efectos colaterales de irradiar el preparado biológico con luz UV [52, 53] pueden ser de magnitud y curso temporal comparables a los del efecto estudiado. Por lo tanto la posibilidad de fotoliberar con luz visible resulta en una enorme ventaja frente a la fotoliberación con luz UV que no debe subestimarse en esta nueva aplicación de nuestros fotoliberadores. Por otro lado, debido al *scattering* (que es inversamente proporcional a λ^4) se obtienen mejores focos y/o mayores penetrancias en el tejido usando longitudes de onda más largas., con lo cual se puede aumentar la profundidad

de la irradiación (aumentar, por ejemplo, el grosor del "slice" de cerebro que estamos midiendo) manteniendo la calidad del punto focal.

Por último, mencionaremos algunas áreas que creemos es importante explorar:

Morfolinos protegidos por grupos fotorremovibles con luz visible.

Aminoácidos protegidos del mismo modo, compatibles con ribosomas.

Explorar la posibilidad de que algunos agonistas de canales y otras proteínas, en su estajo "enjaulado" se comporten como antagonistas (competitivos ?) pues daría lugar a estudios cinéticos del funcionamiento proteico.

Encontrar cromoforos, tanto para el régimen de 1 y 2 fotones, que transfieran energía al centro Ru-bpy, aprovechando la existencia de la "cola" de baja absorbancia del Ru-bpy que se extiende hacia el rojo; en particular con vistas a crear pares ó trios de grupos protectores ortogonales. Candidatos de tales moléculas fluorescentes hay muchos, puesto que la industria de marcadores fluorescentes ha dado frutos de todos los colores con coeficientes de absortividad superiores a 10^5 M^{-1} cm^{-1}.

Por último, una posible aplicación para nuestra metionina enjaulada es la incorporación de un aminoácido enjaulado a péptidos venenosos. Los péptidos venenosos de moluscos, artrópodos e insectos son, muchas veces, agonistas o antagonistas de canales iónicos de diversos tipos, con muy alta especificidad y afinidad. [54] En la mayoría de los casos, estos pequeños péptidos tienen una zona "sin estructura" en ausencia del receptor, y adquieren la estructura por interacción con éste. Disponer de una molécula de esas características que además sea fotoactivable permitiría estudios de los cambios conformacionales que sufren las proteínas en el momento de la interacción.

La mayoría de estas ideas son obvias dado el estado del conocimiento en el tema, pero aún así (o precisamente por eso) muy atractivas. Esto queda demostrado por la reciente incorporación al área de otros grupos de investigación que utilizan grupos protectores fotorremovibles basados en Ru-bpy.[55, 56]

Apéndices

Les digo GRACIAS a todos ustedes, imposible saber a quién porqué:

Al pasaje escribano, las proteínas circularmente permutadas, y la expresión de genes estocástica

A Daniel

Leo, Marce, Richard, Juli, Euge, Euge, Betty, Gaby, Guille, y los que tocaron ese labo que es como el hogar de la infancia, donde todo se dá por sentado y todo hay que hacerlo.

A los que creyeron en mí, porque me dieron fuerza

A lo que no, porque me dieron más

Elisa

Pamá y Mapá

Jorge

A los que se coparon y asombraron con la ciencia conmigo.

A los que me miraron como a un loco

A los que preguntaron : porqué en química ? Porque tuve que pensar para responder.

A Rober.

Mile

A Graciela.

A FCEN, elefante que camina.

A Szczupaklandia

Neurocenas, (las viejas y las nuevas)

Al entusiasmo de Luis, y a Luis

Sótano de la P

A los almuerzos en Solomía con El Vasco

A la SAN, (la nueva y la vieja) y lo que ahí sucede

Al INQUIMAE, y a la comunidad científica-académica increíble de este país de locos.

Minis, nanos, y diosas.

A quienes me apuraron, y a quienes me esperaron

A Maxi y el barro y las charlas a 1280 ºC

A la pileta de verano

A las tardes de los miércoles

Los panqueques en Carlitos y las cervezas en deportes

A Silvi

Cami y Lau, que hace mucho.

A los que avisaron dónde estaban las piedras. Y a los que me dijeron "yo te dije".

A los que me pagaron el sueldo, y a los que no.

Artículos Publicados

"In vivo Photorelease of GABA in the mouse cortex."; Lopes-dos-Santos, V. ; Campi, J. ; Filevich, O. ; Ribeiro, S. ; Etchenique, R. Braz J Med Biol Res. 2011 Jul;44(7):688-93.

"Modulating Surface Density of Proteins via Caged Surfaces and Controlled Light Exposure"; Marta Álvarez, José María Alonso, Oscar Filevich, Maniraj Bhagawati, Roberto Etchenique, Jacob Piehler, and Aránzazu del Campo. Langmuir, 2011, 27 (6), pp 2789–2795

"A caged nicotine with nanosecond range kinetics and visible light sensitivity";, Oscar Filevich, Marcelo Salierno, Roberto Etchenique , Journal of Inorganic Biochemistry 2010 104,1248-1251.

"A Ruthenium-Rhodamine Complex as an Activatable Fluorescent Probe"; Josefina del Mármol, Oscar Filevich, and Roberto Etchenique, Analytical Chemistry 2010 82, 6259–6264

"Encapsulated Petri dish system for single-cell drug delivery and long-term time lapse microscopy Marcelo Salierno, Ricardo Cabrera, Oscar Filevich, Roberto Etchenique, Anal.Biochem, 2007, 15;371(2):208-14.

"1D and 2D temperature imaging with a fluorescent ruthenium complex", Oscar Filevich and Roberto Etchenique, Anal.Chem. 2006, 78,7499-7503.

Capítulos de libros

"Ruthenium for physiology research" Oscar Filevich y Roberto Etchnique.
en "Ruthenium: Properties, Production and Applications",
Editor: David B. Watson. Nova Publishing. ISBN: 978-1-61761-550-4

Artículos Enviados

"Multiphoton Reactive Surfaces using Ruthenium (II) Photocleavable Cages" Verónica San Miguel, Marta Álvarez, Oscar Filevich, Roberto Etchenique, Aránzazu del Campo. Enviado a ChemBioChem.

"Energy transfer from a rhodamine antenna to a ruthenium-bipyridine center." Oscar Filevich, Beatriz García-Acosta, and Roberto Etchenique Enviado a PCCP.

"Caged γ-aminobutyric acid (GABA) based in Ruthenium photochemistry." Oscar Filevich and Roberto Etchenique.
En el que se describe el fotoliberador $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(GABA)]$.

Artículos en preparación

"An Inorganic Photolabile Protecting Group for Visible Light 5-HT Uncaging" Ricardo Cabrera, Beatriz García-Acosta, Oscar Filevich, Roberto Etchenique.

"Ruthenium complexes containing two bipyridyl moeities and nitriles." Oscar Filevich, Beatriz García-Acosta, Roberto Etchenique.

Artículo en el que se describe el compuesto $[Ru(bpy)_2(PMe_3)(MTG)]^{+2}$.
Oscar Filevich, Roberto Etchenique.

Referencias

1. Wolfe, S.A., L. Nekludova, and C.O. Pabo, *DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins.* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2000. **29**: p. 183-212.
2. Balzani, V., S. Campagna, and G. Accorsi, *Photochemistry and photophysics of coordination compounds*. Topics in current chemistry,. 2007, Berlin ; New York: Springer.
3. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase.* J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38482-5.
4. Gratzel, M., *Solar energy conversion by dye-sensitized photovoltaic cells.* Inorg Chem, 2005. **44**(20): p. 6841-51.
5. Nishibayashi, Y., S. Iwai, and M. Hidai, *Bimetallic system for nitrogen fixation: ruthenium-assisted protonation of coordinated N2 on tungsten with H2.* Science, 1998. **279**(5350): p. 540-2.
6. Concepcion, J.J., et al., *Mechanism of water oxidation by single-site ruthenium complex catalysts.* J Am Chem Soc, 2010. **132**(5): p. 1545-57.
7. Hutchinson, L., *Chemotherapy: Cisplatin more effective when given less often.* Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(10): p. 568-568.
8. Damrauer, N.H., et al., *Femtosecond Dynamics of Excited-State Evolution in.* Science, 1997. **275**(5296): p. 54-7.
9. Van Houten, J. and R.J. Watts, *Temperature Dependence of the Photophysical and Photochemical Properties of the Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Ion in Aqueous Solution.* J. Am. Chem. Soc., 1976. **98**(16): p. 4853-4858.

10. Yeh, A.T., C.V. Shank, and J.K. McCusker, *Ultrafast electron localization dynamics following photo-induced charge transfer.* Science, 2000. **289**(5481): p. 935-8.

11. Pinnick, D.V. and B. Durham, *Photosubstitution reactions of Ru(bpy)2XYn+ complexes.* Inorganic Chemistry, 1984. **23**(10): p. 1440-1445.

12. Adams, S.R., V. Lev-Ram, and R.Y. Tsien, *A new caged Ca2+, azid-1, is far more photosensitive than nitrobenzyl-based chelators.* Chem Biol, 1997. **4**(11): p. 867-78.

13. Zayat, L., et al., *A new strategy for neurochemical photodelivery: metal-ligand heterolytic cleavage.* J Am Chem Soc, 2003. **125**(4): p. 882-3.

14. Olabe, J.A. and L.D. Slep, *1.31 - Reactivity and Structure of Complexes of Small Molecules: Nitric and Nitrous Oxide*, in *Comprehensive Coordination Chemistry II*, J.A.M. Editors-in-Chief: and T.J. Meyer, Editors. 2003, Pergamon: Oxford. p. 603-623.

15. Momotake, A., et al., *The nitrodibenzofuran chromophore: a new caging group for ultra-efficient photolysis in living cells.* Nat Methods, 2006. **3**(1): p. 35-40.

16. Salierno, M., et al., *A fast ruthenium polypyridine cage complex photoreleases glutamate with visible or IR light in one and two photon regimes.* J Inorg Biochem, 2010. **104**(4): p. 418-22.

17. Grosman, C. and A. Auerbach, *The dissociation of acetylcholine from open nicotinic receptor channels.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 14102-7.

18. Calvino, M.A., I.R. Iscla, and L. Szczupak, *Selective serotonin reuptake inhibitors induce spontaneous interneuronal activity in the leech nervous system.* J Neurophysiol, 2005. **93**(5): p. 2644-55.

19. Yuste, R., *Circuit neuroscience: the road ahead.* Front Neurosci, 2008. **2**(1): p. 6-9.

20. Huschka, R., et al., *Light-induced release of DNA from gold nanoparticles: nanoshells and nanorods.* J Am Chem Soc, 2011. **133**(31): p. 12247-55.

21. Anderson, J.M., et al., *Host reactions to biomaterials and their evaluation*, in *An Introduction to Materials in Medicine* B.D. Ratner, et al., Editors. 2004, Elsevier Academic Press p. 345-354.

22. *A desirable solution. Biodegradable electronics for medical devices take a step closer.*, in *The Economist*. 2010.

23. Vermot, J., et al., *Reversing blood flows act through klf2a to ensure normal valvulogenesis in the developing heart.* PLoS Biol, 2009. **7**(11): p. e1000246.

24. Hui, E.E. and S.N. Bhatia, *Micromechanical control of cell-cell interactions.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(14): p. 5722-6.

25. San Miguel, V., C.G. Bochet, and A. del Campo, *Wavelength-selective caged surfaces: how many functional levels are possible?* J Am Chem Soc, 2011. **133**(14): p. 5380-8.

26. Fino, E., et al., *RuBi-Glutamate: Two-Photon and Visible-Light Photoactivation of Neurons and Dendritic spines.* Front Neural Circuits, 2009. **3**: p. 2.

27. Nikolenko, V., K.E. Poskanzer, and R. Yuste, *Two-photon photostimulation and imaging of neural circuits.* Nat Methods, 2007. **4**(11): p. 943-50.

28. Zayat, L., M. Salierno, and R. Etchenique, *Ruthenium(II) bipyridyl complexes as photolabile caging groups for amines.* Inorg Chem, 2006. **45**(4): p. 1728-31.

29. Filevich, O., M. Salierno, and R. Etchenique, *A caged nicotine with nanosecond range kinetics and visible light sensitivity.* J Inorg Biochem, 2010. **104**(12): p. 1248-51.

30. Salierno, M., C. Fameli, and R. Etchenique, *Caged Amino Acids for Visible-Light Photodelivery.* European Journal of Inorganic Chemistry, 2008. **2008**(7): p. 1125-1128.

31. Zayat, L., et al., *A new inorganic photolabile protecting group for highly efficient visible light GABA uncaging.* Chembiochem, 2007. **8**(17): p. 2035-8.

32. Ehmke, V., et al., *Peptidomimetic nitriles as selective inhibitors for the malarial cysteine protease falcipain-2.* MedChemComm, 2011. **2**(8): p. 800-804.

33. Lipinski, C.A., *Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution.* Drug Discovery Today: Technologies, 2004. **1**(4): p. 337-341.

34. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.* Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **23**(1-3): p. 3-25.

35. del Marmol, J., O. Filevich, and R. Etchenique, *A ruthenium-rhodamine complex as an activatable fluorescent probe.* Anal Chem, 2010. **82**(14): p. 6259-64.

36. Woolley, P., K.G. Steinhauser, and B. Epe, *Forster-type energy transfer. Simultaneous 'forward' and 'reverse' transfer between unlike fluorophores.* Biophys Chem, 1987. **26**(2-3): p. 367-74.

37. Filevich, O., M. Salierno, and R. Etchenique, *A Caged Nicotine with Nanosecond Range Kinetics and Visible Light Sensitivity.* J Inorg Biochem, 2010.

38. Nikolenko, V., et al., *Two-photon uncaging of neurochemicals using inorganic metal complexes.* Chem Commun (Camb), 2005(13): p. 1752-4.

39. Rial Verde, E.M., et al., *Photorelease of GABA with Visible Light Using an Inorganic Caging Group.* Front Neural Circuits, 2008. **2**: p. 2.

40. Deiters, A., et al., *Photocaged morpholino oligomers for the light-regulation of gene function in zebrafish and Xenopus embryos.* J Am Chem Soc, 2010. **132**(44): p. 15644-50.

41. Pabo, C.O. and R.T. Sauer, *Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition.* Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 1053-95.

42. Esengil, H., et al., *Small-molecule regulation of zebrafish gene expression.* Nat Chem Biol, 2007. **3**(3): p. 154-5.

43. Jacob, F., et al., *[Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator].* C R Hebd Seances Acad Sci, 1960. **250**: p. 1727-9.

44. Saunders, T.L., *Inducible transgenic mouse models.* Methods Mol Biol, 2011. **693**: p. 103-15.

45. Wakiyama, M., et al., *Inducible protein expression in Drosophila Schneider 2 cells using the lac operator-repressor system.* Biotechnol Lett, 2011.

46. Bertani, G., *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli.* J Bacteriol, 1951. **62**(3): p. 293-300.

47. Langenau, D.M., et al., *Cre/lox-regulated transgenic zebrafish model with conditional myc-induced T cell acute lymphoblastic leukemia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(17): p. 6068-73.

48. Flores, M.V., et al., *A hierarchy of Runx transcription factors modulate the onset of chondrogenesis in craniofacial endochondral bones in zebrafish.* Dev Dyn, 2006. **235**(11): p. 3166-76.

49. Taskent-Sezgin, H., et al., *Interpretation of p-cyanophenylalanine fluorescence in proteins in terms of solvent exposure and contribution of side-chain quenchers: a combined fluorescence, IR and molecular dynamics study.* Biochemistry, 2009. **48**(38): p. 9040-6.

50. Cambridge, S.B., et al., *Doxycycline-dependent photoactivated gene expression in eukaryotic systems.* Nat Methods, 2009. **6**(7): p. 527-31.

51. Cui, X. and T. Boland, *Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology.* Biomaterials, 2009. **30**(31): p. 6221-6227.

52. Trautinger, F., et al., *Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation.* J Photochem Photobiol B, 1996. **35**(3): p. 141-8.

53. van der Wees, C., et al., *Nucleotide excision repair in differentiated cells.* Mutat Res, 2007. **614**(1-2): p. 16-23.

54. Lewis, R.J. and M.L. Garcia, *Therapeutic potential of venom peptides.* Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(10): p. 790-802.

55. Garner, R.N., et al., *[Ru(bpy)(2)(5-cyanouracil)(2)](2+) as a Potential Light-Activated Dual-Action Therapeutic Agent.* Inorg Chem, 2011. **50**(19): p. 9213-5.

56. Respondek, T., et al., *Light Activation of a Cysteine Protease Inhibitor: Caging of a Peptidomimetic Nitrile with Ru(II)(bpy)(2).* J Am Chem Soc, 2011.