

# FLUORESzcENS SZENZOR- ÉS JELZŐMOLEKULÁK SZINTÉZISE ÉS VIZSGÁLATA

doktori értekezés tézisei

**Nagy Krisztina**

okleveles vegyész

**Témavezető:**

*Dr. Kele Péter*, egyetemi adjunktus

*Dr. Kotschy András*, az MTA doktora

**KÉMIA DOKTORI ISKOLA**

A Doktori iskola vezetője: *Dr. Inzelt György*

**SZINTETIKUS KÉMIA, ANYAGTUDOMÁNY, BIOMOLEKULÁRIS KÉMIA  
PROGRAM**

Programvezető: *Dr. Perczel András*

egyetemi tanár



Eötvös Loránd Tudományegyetem

Kémiai Intézet

Budapest, 2011.



## 1. Bevezetés, célkitűzések

A doktori értekezés két, független tudományterületen végzett kutatásaimat foglalja össze, melyet egy közös jelenség, a fluoreszcencia köt össze. Munkám első részében fluoreszcens, ún. fotoindukált elektrontranszfer (PET) szenzorok működési mechanizmusának vizsgálatával foglalkoztam. Ez irányú kutatásaink mozgatórugója az a tény volt, hogy szenzorcsaládra jellemző, a szakirodalomban jól leírt működési mechanizmus ellenére anomáliákat tapasztaltunk a jelátviteli folyamat során. Ezen megfigyelésektől inspirálva vizsgáltuk meg annak lehetőségét, hogy milyen más mechanizmus tehető felelőssé az információnak a receptorról a jelkibocsátó egységre való áramlását. Munkám második részében biológiai jelölésre alkalmas, ún. bioortogonális jelzővegyületek szintézisét valósítottam meg. A tématerület népszerűségének ellenére eddig kevés hatékony, az elvárásoknak megfelelő fotofizikai tulajdonságú festékmolekulát állítottak elő. Az e téren elért eredmények képezik dolgozatom második részét.

## 2. Új tudományos eredmények

Az új eredményeket a már említett okokból, és a disszertáció felépítéséhez igazodva két részre bontva ismertetem.

### 2.1. Fotoindukált elektrontranszfer (PET) szenzorok

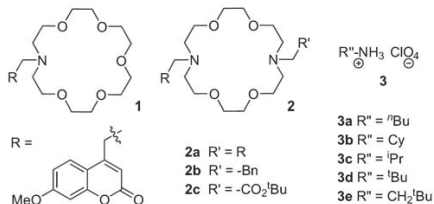
A fotoindukált elektrontranszfer szenzorcsalád működési mechanizmusára jellemző, hogy a fluorofórtól elkülönülő receptorban levő elektron donor részlet a fluoreszcens modul gerjesztett állapotát redukálni képes (fotoindukált elektrontranszfer, PET),<sup>1</sup> megakadályozva így annak fluoreszcenciával történő relaxációját. A vendégmolekula bekötése oly módon változtatja meg az elektron donor rész redox tulajdonságait, hogy már nem képes a gerjesztett állapotú fluoreszcens modul redukációjára. Ennek következményeként a fluoreszcens jel intenzitása a többszörösére növekszik. Az irodalomban elfogadott elmélet szerint a fluoreszcens jel megjelenését kizárólag a vendégmolekula és a receptor közt létrejövő másodlagos kölcsönhatások váltják ki. Ez az elmélet azonban nem minden esetben ad kielégítő magyarázatot. Kutatásaink kiindulópontja az a megfigyelés volt, hogy fluoreszcens szenzorban található elektrongazdag részlet mobilitása

---

<sup>1</sup> de Silva A. P., Gunaratne H. Q. N., Gunnlaugsson T., Huxley A. J. M., McCoy C. P., Rademacher J. T., Rice T. E., *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515-1566.

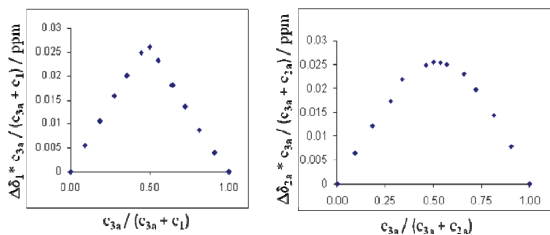
szintén erősen befolyásolja a fluoreszcencens jel intenzitását.<sup>2</sup> Ezen kutatások rávilágítottak egy másik, konformációs dinamikán alapuló mechanizmus létezésére.

**I.** Elméletünk alátámasztása érdekében szimmetrikus és nem szimmetrikus, 1,10-diaza-18-korona-6-éter receptorral rendelkező koronaétereket állítottunk elő (1. ábra). Komplexálási tulajdonságaik meghatározásához különböző térigényű és savasságú ammónium-perklorát sókat alkalmaztunk vendégmolekulaként.



**1. ábra** Az előállított, új PET-szenzorok

**II.** NMR-titrálások segítségével vizsgáltuk a host – guest komplex sztöchiometriáját az ún. Jobb-féle módszer segítségével (2. ábra). A referenciaként vizsgált egy (1), és a két fluorórt tartalmazó (2a) szenzorok n-butilammóniumionnal (3a) különböző molarányban elegyített oldataiban követtük a koronaéter O-CH<sub>2</sub> <sup>1</sup>H-NMR jeleinek eltolódásváltozását. A kémiai eltolódás-változások ( $\Delta\delta$ ) 0,5-ös mólnél megfigyelhető maximuma a komplexek 1:1-es összetételét jelezte.



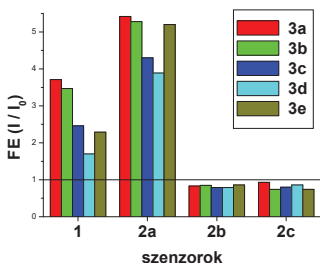
**2. ábra** 1-3a és 2a-3a komplex sztöchiometriameghatározása

A komplexek kötődési konstansait titrálási kísérletekben határoztuk meg. Az eredmények alapján megállapítható volt, hogy 2a szenzor mintegy két nagyságrenddel gyengébben köti a vendégmolekulát az 1-es szenzorvegyülethez képest, ugyanakkor a 2a esetében, főleg nagy

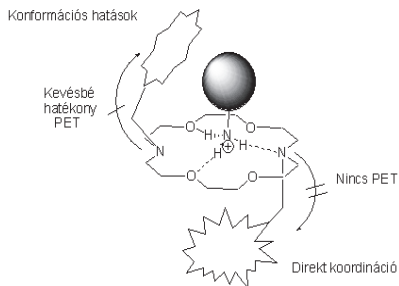
<sup>2</sup> Kele P., Nagy K., Kotschy A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2565-2567.

térigényű vendégmolekulák esetében, nagyobb mértékű változásokat ( $\Delta\delta$ ) figyelhetünk meg. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy két fluorofórt tartalmazó szenzor esetében a rendszer érzékenyebben reagált a vendégmolekula térigényének növekedésére.

**III.** A PET-folyamat hatékonyságának megállapításához megmértük a tanulmányozott szenzorok (**1,2a-c**) maximális fluoreszcens jelerősítését, amit savfelesleg ( $\text{HBF}_4$ ) hatására figyelhetünk meg. A diszubsztituált koronaéterek esetében 3-4-szer akkora erősítést mértünk. Koordinációs kísérleteket végeztünk a már említett különböző ammónium perklorátokkal (**3a-e**), mint vendégmolekulákkal (3. ábra). Az **1** és **2a** szenzornál tapasztalt jelerősítések megfelelnek a vendégmolekulák savasságának, azzal a különbséggel, hogy a **2a** vegyület érzékenyebb detektálást tesz lehetővé. **2b,c** vegyületnél meglepő módon intenzitáscsökkenést tapasztaltunk.



**3. ábra 1, 2a-c szenzorok FE értékei 3a-e jelenlétében**



**4. ábra 2a szenzor működési elve**

**IV.** Az FE értékekben azonos tendencia figyelhető meg az **1** és **2a** szenzornál. Az eltérő érzékenység magyarázatához figyelembe kell vennünk a molekulák szerkezetét. Fluoreszcenciás és röntgenkristallográfiás eredményeink azt mutatták, hogy a **2a** vegyület fluorofór csoportjai transz térállásúak, a koronaéter mindkét oldalát leárnyékolják. Az **1** szenzor esetében a GUEST szabadon hozzáfér a HOST receptorjához, míg a **2a** esetében ez csak úgy lehetséges, ha a komplexálódást megelőzi az egyik kumarin egység térbeli elmozdulása. Hipotézisünk alapján a **2a** vegyületnél megfigyelhető fluoreszcencia serkentés két komponensből tevődik össze:

- a, a nitrogénatomhoz történő direkt koordináció (**1**-nél kizárólagos mechanizmus)
- b, az ellenoldali nitrogén környezetének mozgásszabadság-változása (4. ábra)

NMR-kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a **2b,c** szenzoroknál fluorofórhoz kapcsolódó nitrogénhez direkt koordináció nem valósul meg, a vendégmolekulák a fluorofórral átellenes nitrogénhez kötődnek. A komplexálódás során az ellenoldali nitrogénhez történő koordináció

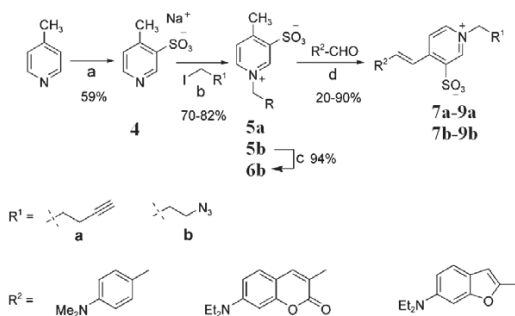
valószínűleg oly módon változtatja meg a fluorofórhoz kapcsolódó N-atom körüli környezet konformációját, hogy az hatékonyabb PET folyamatot tesz lehetővé. Ezzel magyarázzuk a fluoreszcencia intenzitásának kismértékű csökkenését a vendégmolekulák koordinációjakor.

Eredményeink alapján megállapítást nyert, hogy a hagyományos elmélettel szemben a komplexálódás következtében kialakuló konformációváltozás is fluoreszcencia intenzitásváltozást idézhet elő PET szenzorokban. A két hatás külön-külön, vagy együttesen tehető felelőssé a megfigyelhető fluoreszcencia változásokért.

## 2.2. Fluoreszcens jelzőmolekulák

A biomolekulák képalkotó technikákkal történő tanulmányozása fontos szerepet tölt be az élő szervezetekben lejátszódó folyamatok megértésében. Természetes jelzővegyületeken kívül szükség van szintetikusan előállított festékek alkalmazására is, amelyeket a bioortogonalitás elvével egyezően kell bejuttatni a biológiai mintába. Erre a célra különösen alkalmas a réz(I) által katalizált 1,3-dipoláris cikloadíció (CuAAC). Felhasználás szempontjából a spektrum távoli vörös, közeli IR tartományában emittáló, nagy Stokes-eltolódással bíró jelzőmolekulák kiemelkedő jelentőségűek. A felsorolt előnyök ellenére kevés kedvező fotofizikai tulajdonságú, klikk-reakcióba vihető festékvegyület létezik.

I. Irodalmi analógiák<sup>3</sup> és saját tapasztalataink<sup>4</sup> alapján polimetin struktúrájú, kiterjedt delokalizációval rendelkező, könnyen és kis költséggel előállítható, bioortogonális (CuAAC) reakcióba vihető, fluoreszcens jelzővegyületeket terveztünk, és állítottunk elő (5. ábra).



5. ábra Klikk-reakcióba vihető NIR fluorofórok előállítása

<sup>3</sup> Czerney P., Wenzel M., Schweder B., Lehmann F., US20040260093, 2004.

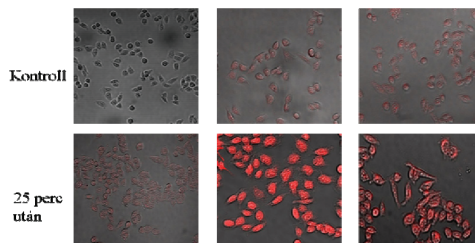
<sup>4</sup> Kele P., Li X., Link M., Nagy K., Herner A., Lőrincz K., Béni Sz., Wolfbeis O. S., *Org. Biomol. Chem.* 2009, 7, 3486-3490.

**II.** Megvizsgáltuk az előállított festékek fotofizikai tulajdonságait (1. táblázat) metanolban, és fiziológias kémhatású (pH=7,4) foszfát-pufferben (PBS). A festékek minden esetben 100 nm-nél nagyobb Stokes-shifttel és kiváló fotostabilitással rendelkeznek. Fontos tény, hogy gerjesztésük megvalósítható a fluoreszcens technikákban alkalmazott lézerek segítségével és a várakozásainknak megfelelően, a spektrum távoli vörös-közeli IR régiójában emittálnak.

Festék	Oldószer	$\lambda_{\max}$ (gerj) [nm]	$\lambda_{\max}$ (em) [nm]	$\epsilon$ ( $\times 10^4$ ) [ $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ ]	$\Phi^a$
7	MeOH	519	625	5,6	0,8
	PBS	523	630	4,3	-
8	MeOH	538	674 (695)	4,8	15,7
	PBS	544	675 (697)	5,3	1,0
9	MeOH	586	735	4,0	1,0
	PBS	588	744	2,8	-

**1. táblázat** *Klikk-reakcióba vihető NIR fluorofórok fotofizikai tulajdonságai*  
*[a]: krezil-ibolya referenciát használtunk,  $\Phi_F^0 = 0,545$  MeOH-ban*

**III.** Az előállított mega-Stokes tulajdonságú jelzőmolekuláink biológiai alkalmazhatóságát sejtfestési eljárások során teszteltük. Ehhez sejtfelszíni glikoproteinben gazdag CHO-sejteket használtunk, melyek sejtfelszíni glikánstruktúráját metabolikusan módosítottuk, egy nem természetes cukor, acetamidomannózamin (ManNAz) segítségével. A sejtfestési kísérletek mindhárom alkin funkcióval ellátott festékünkkel eredményesnek bizonyultak. (6. ábra), a nem-specifikus kötődés mértéke elhanyagolható. Egy esetben (**9a**) a sejtfestés időfüggését is vizsgáltuk, amelynek eredményeképp már öt perc után láthatóvá váltak a sejtmembránok. Vegyületeink jelentőségét jól jelzi, hogy azok már kereskedelmi forgalomban is kaphatóak.



**6. ábra** *Fixált CHO-sejtek jelölése 7a-9a festékekkel PBS pufferben*  
*(konfokális mikroszkópos felvételek)*

### 3. Tudományos közlemények, előadások és poszterek

#### **Közlemények**

##### ***A dolgozat alapjául szolgáló közlemények***

1. *Substituent dependent fluorescence response of diazacrown-based PET sensors*  
Krisztina Nagy, Szabolcs Béni, Zoltán Szakács, Attila C. Bényei, Béla Noszál, Péter Kele and András Kotschy  
*Tetrahedron*, **2008**, *64*, 6191-6195.

2. *Clickable long-wave "megaStokes" fluorophores for orthogonal chemoselective labeling of cells*  
Krisztina Nagy, Erika Orbán, Szilvia Bösze, Péter Kele  
*Chemistry – An Asian Journal* **2010**, *5*, 773-777.

##### ***További közlemények***

3. *Conformational dynamics based sensor technology*  
Péter Kele, Krisztina Nagy, András Kotschy:  
*Angewandte Chemie, International Edition* **2006**, *45*, 2565-2567.

4. *Clickable fluorophores for biological labeling – with or without copper*  
Péter Kele, Xiaohua Li, Martin Link, Krisztina Nagy, András Herner, Krisztián Lőrincz, Szabolcs Béni, Otto S. Wolfbeis  
*Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, *17*, 3486-3490.

##### ***Előadások***

1. *Bioortogonális jelölésre alkalmazható polimetin alapú közeli IR fluorofórok szintézise és alkalmazása*  
Nagy Krisztina, Orbán Erika, Bösze Szilvia, Kele Péter  
MTA Heterociklusos munkabizottsági ülés, Balatonszemes, 2009. május 20-22.

2. *Bioortogonális jelölésre alkalmazható polimetin alapú fluorofórok szintézise és alkalmazása*  
Nagy Krisztina, Orbán Erika, Kele Péter:  
IX. Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, 2009. április 23-24.

3. *Szubsztituensfüggő fluoreszcencia-serkentés diazakerona alapú PET szenzorokban*  
Nagy Krisztina, Béni Szabolcs, Szakács Zoltán, Bényei Attila, Noszál Béla, Kotschy András, Kele Péter  
MTA Heterociklusos munkabizottsági ülés, Balatonszemes, 2008. május 21-23.

4. *Konformációs dinamikán alapuló koronaéter típusú szenzorok összehasonlító vizsgálata*  
Béni Szabolcs, Nagy Krisztina, Szakács Zoltán, Kele Péter  
VIII. Clauder Ottó Emlékverseny, Budapest, 2007. április 12-13.

5. *Development of conformational dynamics based sensors*  
Péter Kele, Krisztina Nagy, András Kotschy  
1st European Chemistry Congress, Budapest, 2006, augusztus 27-31.



## **Poszterek**

### *1. Polymethine based NIR click fluorophores for bioorthogonal labeling*

Krisztina Nagy, Erika Orbán, Szilvia Bősze, Péter Kele  
XI. Methods and Applications of Fluorescence, Budapest, 2009. szept. 6-9.

### *2. Fluorescent sensing effected by conformational mobility*

Krisztina Nagy, Péter Kele, Szabolcs Béni, Zoltán Szakács, Béla Noszál, András Kotschy  
X. Methods and Applications of Fluorescence, Salzburg, 2007. szept. 9-12.

### *3. Fluorescent sensing effected by conformational mobility*

Krisztina Nagy, Szabolcs Béni, Péter Kele, Zoltán Szakács, Béla Noszál, András Kotschy  
XII. Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Tihany, 2007. június 10-13.

### *4. Monoaza- és diazazonaéter alapú szenzorok összehasonlítása*

Nagy Krisztina, Béni Szabolcs, Kele Péter, Szakács Zoltán, Noszál Béla, Kotschy András  
Centenáriumi Vegyészkonferencia, Sopron, 2007. máj.29-jún. 1.

### *5. Nagy Krisztina, Kele Péter, Bényei Attila, Béni Szabolcs, Szakács Zoltán, Noszál Béla, Kotschy András*

#### *Monoaza- és diazazonaéter alapú szenzorok összehasonlítása*

XII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Csíkszereda, 2006. október 3-8.  
Diákposzter kategória, I.díj

### *6. Development of conformational dynamics based sensors*

Péter Kele, Krisztina Nagy, András Kotschy  
1st European Chemistry Congress, Budapest, 2006. aug. 27-31.