

AKI kíváncsi kémikus
nyári kutatótábor **2016**

KRÓNIKA

MTA Természettudományi Kutatóközpont

Felelős kiadó: Dr. Tompos András
Kiadja: MTA Természettudományi Kutatóközpont
1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2.
Honlap: www.ttk.mta.hu/kutatotabor

Szerkesztő: Lendvayné dr. Győrik Gabriella
Borítóterv és tördelés: Kovács János

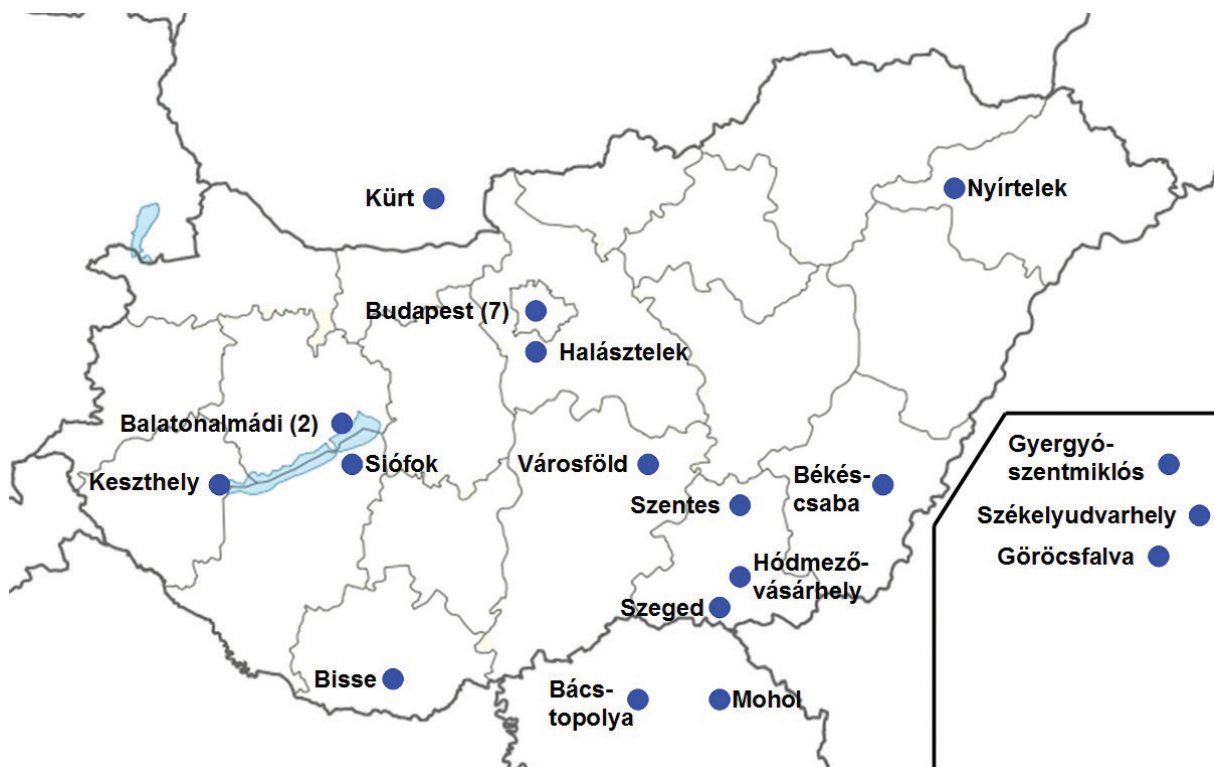
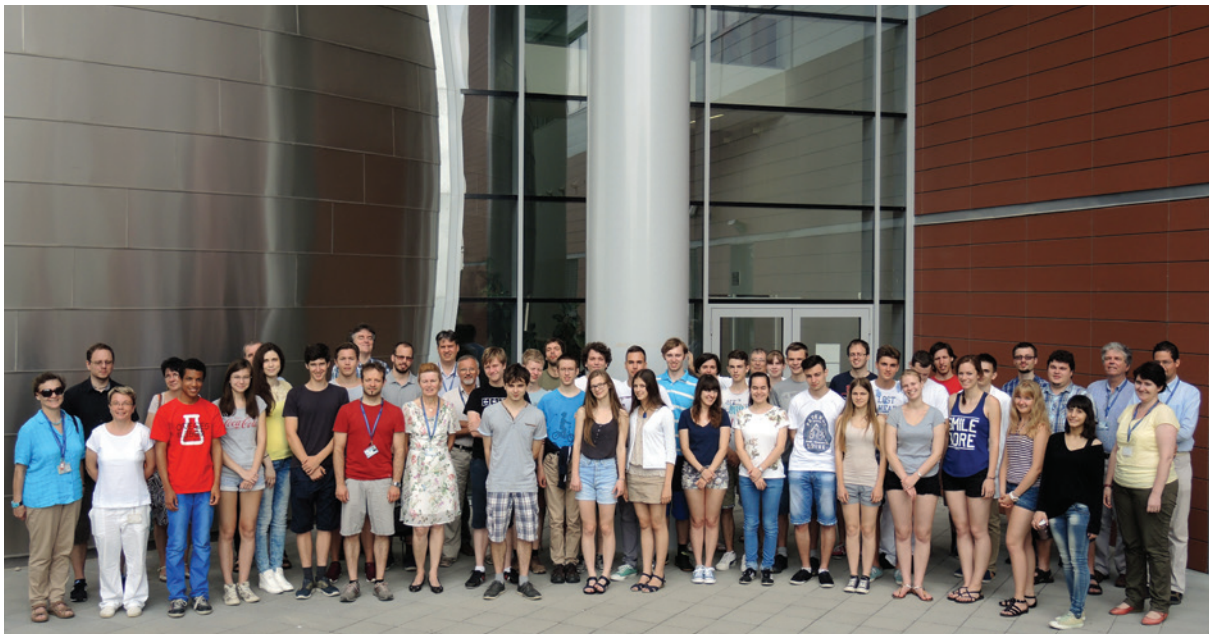
Készült a Possum Kft gondozásában
Felelős vezető: Várnagy László
Tel.: + 36 209-345-318
e-mail: info@possumkft.hu
ISBN 978-963-7067-34-1

Az „AKI Kíváncsi Kémikus” kutatótábor az MTA Természettudományi Kutatóközpont és a Bayer Hungária Kft. MSMS pénzügyi támogatásával jött létre.



TARTALOMJEGYZÉK

	ELŐSZÓ	5
1	Nyolc táborral a hátunk mögött	6
2	RÉSZTVEVŐK	8
3	TÉMÁK / TÉMAVEZETŐK / DIÁKOK	10
4	PROGRAM	12
5	MINISZIMPÓZIUM	15
6	LABORMUNKÁBAN	16
7	LABORLÁTOGATÁS	18
8	DOLGOZATOK	
	<i>Csiszer Mónika, Kós Tamás, Polgár Patrik</i>	
	A DNS replikációban kulcsszerepet játszó PCNA fehérje kifejezése E. Coli expressziós rendszerben	19
	<i>Németh Virág Alexandra, Ótott Péter</i>	
	Fluoreszcens fehérjék vizsgálata sejtekben	22
	<i>Balbisi Mirjam, Marozsák Tóbiás</i>	
	Hogyan épül fel a sejtmembrán? - Egyszerű modellek előállítása és vizsgálata	25
	<i>Nyariki Noel</i>	
	Gyógyszermolekula tervezése számítógép segítségével	30
	<i>Arany Eszter, Kovács Márton</i>	
	Liposzómás gyógyszerhordozók előállítása	34
	<i>Orosz Máté, Szabó Renáta</i>	
	Egy új szerves molekula előállítása és jellemzése	38
	<i>Fülöp Anita-Petra, Tóth Brigitta</i>	
	Az illatok kémiája	41
	<i>Balogh Ádám, Pósa Szonja Polett</i>	
	Kétdimenziós kémia	47
	<i>Czakó Áron, Valtner Tamás</i>	
	Polimerek – Az óriásmolekulák csodálatos világa	51
	<i>Gräff Ádám Tamás, Hermann Regina</i>	
	Vegyianyagok előállítása lignocellulózból	54
9	HOZZÁJÁRULÁSOK	57
10	TÁBORI ÉLET KÉPEKBEN	58



ELŐSZÓ



Kedves Olvasó!

Az „AKI Kíváncsi Kémikus” kutatótábor krónika sorozat nyolcadik kötetét tartja kezében, amelyben áttekintést nyújtunk a 2016. évi kutatótábor egész heti programjáról, a kutatási témákról, az azokat vezető kutatókról és a munkába bekapcsolódó középiskolásokról. A kötet legértékesebb és egyben legterjedelmesebb részét azok a beszámolók teszik ki, amelyekben a diákok leírták, hogy mit, miért és hogyan dolgoztak a laborokban, milyen eredményeket kaptak és azokból milyen következtetéseket vontak le. A tábori események illusztrálására

felhasználtuk a laborokban és a miniszimpoziumon készült fotókat, de helyet kaptak a munka utáni programokon készült felvételek is.

Három intézet, az Anyag- és Környezetkémiai Intézet, a Szerves kémiai intézet és az Enzimológiai Intézet kutatói adták azt a tizenkét projektet, amin huszonöt diák dolgozhatott egy hétig. A kutatótábor munkájában először 2016-ban részt vevő intézet, az Enzimológiai Intézet két biológiai témával színesítette a választékot.

A benyújtott pályamunkák alapos bírálata után a legjobb pályázatokat készítő huszonöt középiskolást tudtuk fogadni a kutatótábor hetére. A túloldali térkép mutatja, hogy a diákok tizennyolc településről érkeztek kutatóközpontunkba, közülük hatan határon túlról. A térképen feltüntetett települések némelyike egyetemi városoktól távol esik. Külön örülünk, hogy olyan helységekből származó diákoknak is fogalmuk lehet a kutatók munkájáról, akiknek ez a tábor nélkül csak nagy nehézségek árán sikerülhetett volna.

Kiadványunkat mindazoknak ajánljuk, akik segítették a diákokat abban, hogy aktívan részt tudjanak venni tehetséggondozó programunkban: köszönjük a szülőknek a szeretetteljes érzelmi háttérrel, köszönjük a tanároknak a biztos szaktárgyi alapokat, és, hogy sikerült felkelteniük a diákokban az érdeklődést a természettudományok iránt.

A kutatótáborban részt vett diákok diáktársaik dolgozatainak olvasása közben elmélyedhetnek a többi tábori témában is. Számukra ez egyben emlékkönyvként is szolgálhat: feleleveníthetik a munka izgalmas és a kikapcsolódás önfeledt pillanatait. Kívánom, hogy élvezettel olvassák kiadványunkat!

Dr. Tompos András
igazgató

1 NYOLC TÁBORRAL A HÁTUNK MÖGÖTT



Nyolc táborral a hátunk mögött már érdemes visszatekinteni. Hogy kezdtük 2009-ben, és mi változott azóta?

Az első táborot még egyetlen intézet, az Anyag- és Környezetkémiai Intézet (innen a tábor nevében az AKI) rendezte az akkori Kémiai Kutatóközpontban a Pusztaszeri úton. A kutatótáborral kapcsolatos sok pozitív tapasztalat – érdeklődő diákok, szorgos munka a laborokban, szép előadások a zárónapi szimpóziumon – híre elterjedt a Kémiai Kutatóközpontban, és a többi intézet kutatói is kedvet kaptak a témavezetéshez. 2010-től aztán a korábbi polimer előállítás, biomassa vizsgálattal, fullerénnel, gázfázisú reakciókkal foglalkozó témák mellett új szerves molekulák előállításával, katalizátorokkal,

anyagszerkezet meghatározó és analitikai eljárásokkal is megismerkedhettek a diákok. Idővel azután olyan kutatásokba is bekapcsolódhattak, melyek a biológiai és a kémia határterületére vezettek: gyógyszerek, gyógyszerhordozók, sejtmembrán modellek voltak a vizsgálatok tárgyai.

A kutatótábor sorozatot még a többszöri szervezeti átalakulások és a laboroknak a Pusztaszeri útról Lágymányosra, a Magyar tudósok körújtára költöztetése sem törte meg, sőt azzal, hogy a Kémiai Kutatóközpontból más intézetekkel együtt létrejött a Természettudományi Kutatóközpont, tovább bővült a témaválaszték. 2016-ban két biológiai kutatási témával csatlakozott programunkhoz az Enzimológiai Intézet.

A résztvevő intézmények és a helyszín megváltoztak ugyan, de azok a célok, melyeket az első kutatótábor szervezésekor megfogalmaztunk, megmaradtak:

1. a diákok érdeklődésének felkeltése a természettudományos tárgyak, ezen belül is elsősorban a kémia iránt;
2. a fiatalok segítése a pályaválasztásban;
3. tehetséggondozás;
4. az érdeklődő diákokkal hosszabb távra ható kapcsolat kialakítása, kutatói utánpótlás nevelés.

Azt tapasztaltuk, hogy a diákok érdeklődését nem kell felkelteni, hiszen a pályázataikból kiderül, hogy ők már alaposan meg vannak fertőzve a természettudományokkal – ezen a ponton nem lehet eléggé hangsúlyozni tanáraiknak ebben betöltött szerepét. A diákok eddig mind a nyolc évben kiemelték, hogy mennyire jó volt, hogy hasonló érdeklődésű diákok jöttek össze egy hétre. A kémia és a biológia szeretete mint közös érték segített áthidalni az egyéb különbségeket: voltak fővárosból, távoli kis településekről, határon túlról érkezők; egyetemi városok elit gimnáziumában tanulók, vagy kevésbé rangos iskolába járók; esetleg a nyelvi környezetük, a családjuk anyagi helyzete volt eltérő. A kutatótáborban kialakított elfogadó légkörben ezeket a másságokat a különbözőségek megismerésének lehetőségeként élték meg a diákok, sőt szoros barátságok is szövődtek közöttük. A pályaválasztásukat segíti, hogy egyrészt témavezetőiken keresztül megismerhetik a kutatók mindennapjait, másrészt magukat is kipróbálhatnak olyan tevékenységekben, amelyek a kutatói léthez tartoznak: pályázatot írnak, kísérleti munkát végeznek, értelmezik az eredményeiket, előadást tartanak, végül dolgozatot írnak. Emellett a középiskola utáni következő lépcsőfok, az egyetem választásában is tudunk segíteni. A harmadik táborról kezdődően – immáron hat éve –, ebben óriási segítőink a volt kutatótáborozók, akik egyetemistaként jönnek vissza mesélni egyetemi tapasztalataikról a náluk csak néhány évvel fiatalabb kutatótáborozóknak.

A tehetséggondozás személyre szabott foglalkozást jelent a diákok által választott témában. Valamely projekten két diák általában két témavezető irányításával dolgozik, miközben különleges anyagokat, eljárásokat ismerhetnek meg, megtanulhatják bonyolult műszerek működési elvét és kezelését. A kapott adatokat a kutatókkal együtt kiértékelik, az eredményekre magyarázatot keresnek, majd előadásba, dolgozatba foglalják tapasztalataikat. Több diáknál a kutatótáborral az itteni munka nem fejeződik be, hanem visszajárnak iskolai szünetekben, hogy a megkezdett vagy egy új projekten dolgozhassanak. Gyakran előfordul, hogy ezt egyetemistaként, sőt PhD hallgatóként is folytatják. Ezen a ponton kapcsolódtunk a kutatói utánpótlás nevelés kérdéséhez. Az eddigi nyolc táborban 198 diák vett részt, közel 80 %-uk egyetemista korbba jutott, és ők mindannyian felsőfokú, vagy már posztgraduális tanulmányokat folytatnak, a többiek még középiskolások. Az egyetemisták 1-2 kivétellel természet- vagy műszaki tudományokat hallgatnak. 14-en töltötték a kutatóközpontban nyári gyakorlatukat, vagy végeztek hosszabb-rövidebb ideig kutatómunkát. 8-an készítették vagy készítik itt diplomamunkájukat, és az első táborunk egyik résztvevője PhD hallgató kutatóközpontunkban. Többen készülnek kutatói pályára az MTA TTK-n kívül is egyetemen, kutatóintézetben, Magyarországon és külföldön.

Céljaink, és értékrendünk, ami mentén a kutatótábor szervezzük és rendezzük, nyolc év óta

változatlanok. Bízunk benne, hogy lendületünk tovább viszi ezt a programot. Köszönjük a szülőknek, és az iskoláknak, hogy kíváncsi, éles eszű, olykor kételkedő, emellett kitartó és szorgalmas diákokkal foglalkozhatunk évről évre. Köszönjük a Természettudományi Kutatóközpontnak és a Bayer Hungária Kft-nek, hogy anyagi támogatásukkal biztosítani tudjuk a diákoknak a szállást, étkezést és utazást. Külön köszönjük a témavezetőknek és a többi segítőnek, hogy egyrészt minden anyagi ellenszolgáltatás nélkül, másrészt nem csak munkaidőben foglalkoztak a diákokkal.

Lendvayné dr. Győrik Gabriella

Lendvayné dr. Győrik Gabriella
a kutatótábor szervezője



Az MTA Központi Kémiai Kutatóközpont (MTA KK) a Pusztaszeri úton



Az MTA TTK épülettömbje ma

2 RÉSZTVEVŐK



Arany Eszter Sára
Lovassy László Gimnázium,
Veszprém



Felföldi Luca
Lovassy László Gimnázium,
Veszprém



Balbisi Mirjam
Jedlik Ányos Gimnázium,
Budapest



Fülöp Anita-Petra
Tamási Áron Elméleti Líceum,
Székelyudvarhely, Románia



Balogh Ádám
Szerb Antal Gimnázium,
Budapest



Gräff Ádám Tamás
ELTE Radnóti Miklós Gyakorló
Gimnázium,
Budapest



Czakó Áron
Nyíregyházi Krúdy Gyula
Gimnázium,
Nyíregyháza



Hermann Regina
Vörösmarty Mihály Gimnázium,
Budapest



Csiszer Mónika
Márton Áron Főgimnázium,
Csíkszereda,
Románia



Kopacz Zsófia
Tamási Áron Elméleti Líceum,
Székelyudvarhely,
Románia



Eszenyi Bálint
Pécsi Kodály Zoltán
Gimnázium,
Pécs



Kós Tamás
Eötvös József Gimnázium,
Budapest



Kovács Márton
Eötvös József Gimnázium,
Budapest



Polgár Patrik Zoltán
Keszthelyi Vajda János
Gimnázium,
Keszthely



Lévárdi Ádám
Pázmány Péter Gimnázium,
*Nové Zámky – Érsekújvár,
Szlovákia*



Pósa Szonja Polett
Bethlen Gábor Református
Gimnázium,
Hódmezővásárhely



Marozsák Tóbiás
Óbudai Árpád Gimnázium,
Budapest



Szabó Renáta
Katona József Gimnázium,
Kecskemét



Németh Virág Alexandra
Lovassy László Gimnázium,
Veszprém



Szvorenny Viktor
Bolyai Tehetséggondozó
Gimnázium,
*Zenta,
Szerbia*



Nyariki Noel
Berzsenyi Dániel Gimnázium,
Budapest



Tóth Brigitta
Bethlen Gábor Református
Gimnázium,
Hódmezővásárhely



Orosz Máté
Békéscsabai Andrassy Gyula
Gimnázium,
Békéscsaba



Valtner Tamás
Dositej Obradović Gimnázium
és Közgazdasági iskola,
*Topolya,
Szerbia*



Ótott Péter
Szegedi Radnóti Miklós
Kísérleti Gimnázium,
Szeged

3 TÉMÁK / TÉMAVEZETŐK / DIÁKOK

A 9,9'-biantril különleges fluoreszcenciája

Demeter Attila, *PhD, DSc, tudományos tanácsadó*

Harangozó József, *tudományos segédmunkatárs*

Eszenyi Bálint

A DNS replikációban kulcsszerepet játszó PCNA fehérje kifejezése E. coli expressziós rendszerben

Szeltner Zoltán, *PhD, tudományos főmunkatárs*

Póti Ádám, *tudományos segédmunkatárs*

Csiszer Mónika

Kós Tamás

Polgár Patrik Zoltán

Az illatok kémiája

Fegyverneki Dániel, *tudományos segédmunkatárs*

Ferenczi-Palkó Roberta, *PhD, tudományos munkatárs*

Fülöp Anita-Petra

Tóth Brigitta

Egy új szerves molekula előállítása és jellemzése

Ábrányi-Balogh Péter, *PhD, tudományos munkatárs*

Sóvári Dénes, *egyetemi hallgató*

Orosz Máté

Szabó Renáta

Fluoreszcens fehérjék vizsgálata sejtekben

Besztercei Balázs, *tudományos segédmunkatárs*

Baksa Attila, *tudományos segédmunkatárs*

Németh Virág Alexandra

Ótott Péter

Gyógyszertervezés számítógépes módszerekkel

Bajusz Dávid, *tudományos segédmunkatárs*

Kiss Dóra Judit, *tudományos segédmunkatárs*

Kopacz Zsófia

Nyariki Noel

Hogyan épül fel a sejtmembrán? Egyszerű modellek előállítása és vizsgálata

Mihály Judith, *PhD, tudományos főmunkatárs*

Keszthelyi Tamás, *PhD, tudományos főmunkatárs*

Balbisi Mirjam

Felföldi Luca

Marozsák Tóbiás

Katalízis fűvel-fával: vegyi anyagok előállítása lignocellulózból

Rosenbergerné Mihályi Magdolna, *PhD, tudományos főmunkatárs*

Barthos Róbert, *PhD, tudományos főmunkatárs*

Balla Áron, *tudományos segédmunkatárs*

Hermann Regina

Gräff Ádám Tamás

Kétdimenziós kémia

Mohai Miklós, *PhD, tudományos főmunkatárs*

Klébert Szilvia, *PhD, tudományos főmunkatárs*

Balogh Ádám

Pósa Szonja Polett

Liposzómás gyógyszerhordozó rendszerek

Szigyártó Imola Csilla, *PhD, tudományos munkatárs*

Deák Róbert, *tudományos segédmunkatárs*

Wacha András, *PhD, tudományos munkatárs*

Arany Eszter Sára

Kovács Márton

Mennyi energiát nyerhetünk ki egy elektrokémiai áramforrásból (elemből, akkumulátorból)?

Pajkossy Tamás, *PhD, DSc, tudományos tanácsadó*

Mészáros Gábor, *PhD, tudományos főmunkatárs*

Lévárdi Ádám

Szvoreny Viktor

Polimerek – Az óriásmolekulák csodálatos világa

Bencskó György, *tudományos segédmunkatárs*

Szabó Ákos, *PhD, tudományos munkatárs*

Czakó Áron

Valtner Tamás

4 PROGRAM



Június 26., vasárnap

- 14:00 – 17:00 Diákok érkezése a kollégiumba
- 17:00 – 18:00 A táborral kapcsolatos megbeszélés
- 18:00 – 20:00 Játékos ismerkedés
- 21:00 – 23:00 Foci EB meccsnézés a MOM parkban

Június 27., hétfő

- 9:00 Gyülekező a TTK portájánál
- 9:15 Kutatótábor megnyitó
Köszöntő: Dr. Tompos András igazgató
Ismeretterjesztő előadás: Dr. Szabó Ákos: Lehet intelligens egy polimer?
- 10:00 Csoportkép
- 10:15 Tűzvédelmi oktatás
- 11:00 Laborlátogatások
- 12:30 Ebéd
- 13:30 Munka a laborokban
- 16:50 Gyülekező a portán, séta az ELTE és a BME kampuszán, hajókirándulás
- 19:00 Érkezés a kollégiumhoz
- 20:00 Volt kutatótáborozók, Janzsó Péter és Sággy Péter mesélnek az egyetemeikről (BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, ill. The University of Edinburgh)

Június 28., kedd

- 9:00 Gyülekező a TTK portájánál
- 9:10 Laborlátogatások
- 10:40 Munka a laborokban (közben ebéd)
- 15:50 Gyülekező a portánál, kirándulás a János-hegyre
- 20:00 Érkezés a kollégiumhoz

Június 29., szerda

- 9:00 Munka a laborokban (közben ebéd)
16:00 Chemical Singers hangverseny (földszinti nagyterem)
17:00 Gyülekező a portánál, utazás a kollégiumhoz
18:00- 20:00 Diákok-Témavezetők foci- és kosármeccs a kollégium sportpályáján
20:30 Volt kutatótáborozók, Gonda Imre (SE Gyógyszerész Kar) és Sütő Péter (ELTE TTK kémia) előadásai egyetemeikről

Július 30., csütörtök

- 9:00 Munka a laborokban (közben ebéd)
16:50 Gyülekező a portánál, utazás a kollégiumhoz
19:00 - 20:00 Társasjáték: „Kémikusok más szerepben”.
Játékvezető: Dr. Paszternák András
20:00 - 21:00 Gajda Gergely, volt kutatótáborozó beszámolója az egyeteméről (University College London, Biological Sciences)

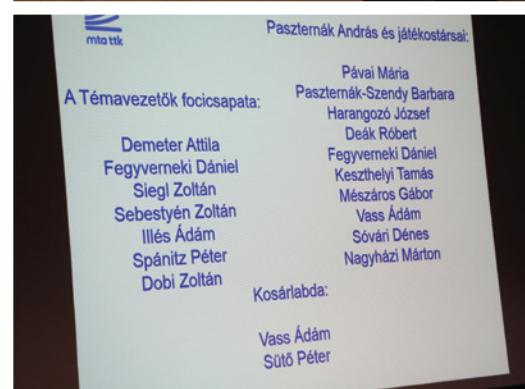
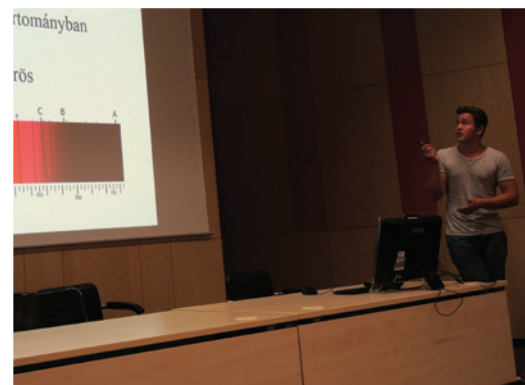
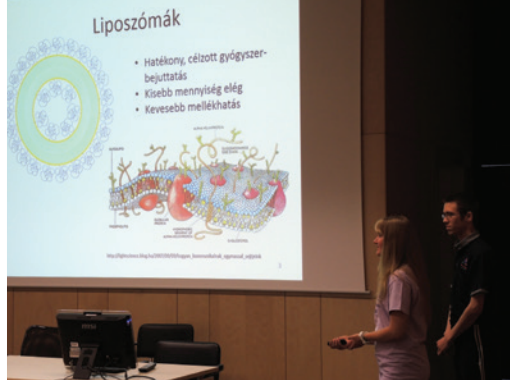
Július 1. péntek

- 9:00 Munka a laborokban (közben ebéd)
13:00 „AKI kíváncsi kémikus” Miniszimpozium a Diákok előadásaival
16:00 A kutatótábor Dr. Tompos András igazgató zárja
16:30 Fogadás a jelenlegi és volt kutatótáborozók, témavezetőik és vendégeink részére
17:30 Távozás a kutatóközpontból a kollégiumba
20:00 - 22:00 Esti séta a Várban

Július 2., szombat

- 11:00-ig Diákok távozása a kollégiumból





5 MINISZIMPÓZIUM

Helyszín: MTA TTK Kutatóház földszinti előadóterem, Budapest, Magyar tudósok körútja 2.
Időpont: 2016. július 1. 13:00 – 16:20

13:00 – 13:05

A miniszimpóziumot megnyitja:
Tompos András, igazgató, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

13:05 – 14:46

Biológiai és szerves kémia szekció
vezeti: **Keszthelyi Tamás**, tudományos főmunkatárs

13:05 – 13:20

Csiszer Mónika, Kós Tamás és Polgár Patrik Zoltán:
A DNS replikációban kulcsszerepet játszó PCNA fehérje kifejezése E. coli expressziós rendszerben

13:23 – 13:33

Németh Virág Alexandra és Ótott Péter:
Fluoreszcens fehérjék vizsgálata sejtekben

13:36 – 13:51

Balbisi Mirjam, Felföldi Luca és Marozsák Tóbiás:
Hogyan épül fel a sejtmembrán? Egyszerű modellek előállítása és vizsgálata

13:54 – 14:04

Kopacz Zsófia, Nyariki Noel:
Gyógyszertervezés számítógépes módszerekkel

14:07 – 14:17

Arany Eszter Sára és Kovács Márton:
Liposzómás gyógyszerhordozó rendszerek

14:20 – 14:30

Orosz Máté, Szabó Renáta:
Egy új szerves molekula előállítása és jellemzése

14:33 – 14:43

Fülöp Anita-Petra és Tóth Brigitta:
Az illatok kémiája

14:46 – 14:56

Frissítő szünet

14:56 – 15:57

Anyagkémia szekció
vezeti: **Demeter Attila**, tudományos tanácsadó

14:56 – 15:06

Balogh Ádám és Pósa Szonja Polett:
Kétdimenziós kémia

15:09 – 15:19

Czakó Áron és Valtner Tamás:
Polimerek – Az óriásmolekulák csodálatos világa

15:22 – 15:28

Eszenyi Bálint:
A 9,9'-biantril különleges fluoreszcenciája

15:31 – 15:41

Hermann Regina és Gräff Ádám Tamás:
Katalízis fűvel-fával: vegyianyagok előállítása lignocellulózból

15:44 – 15:54

Lévárdi Ádám és Szvorenny Viktor:
Mennyi energiát nyerhetünk ki egy elektrokémiai áramforrásból?

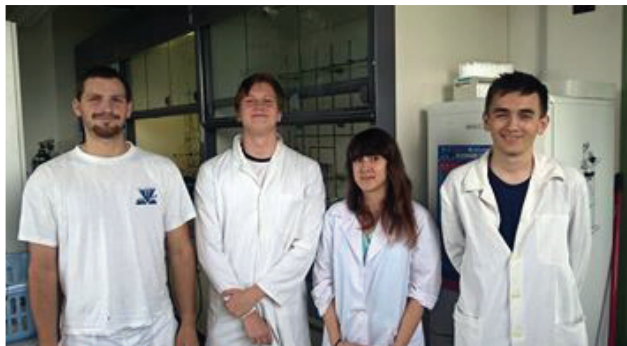
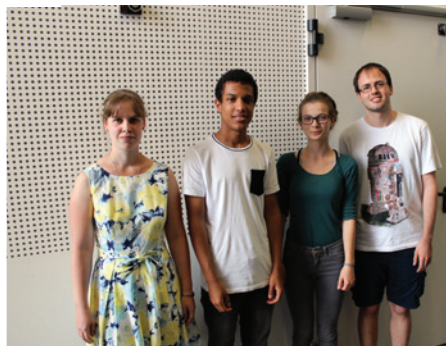
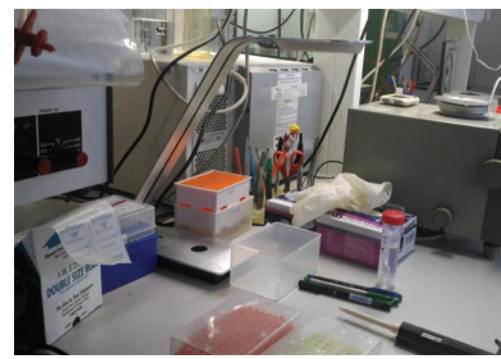
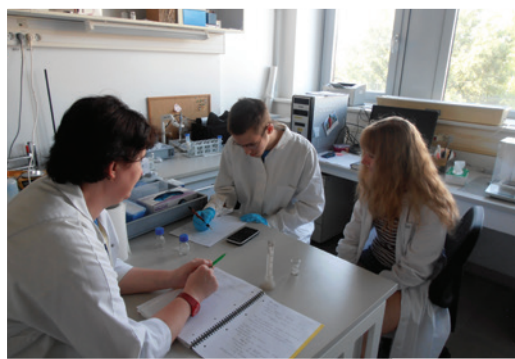
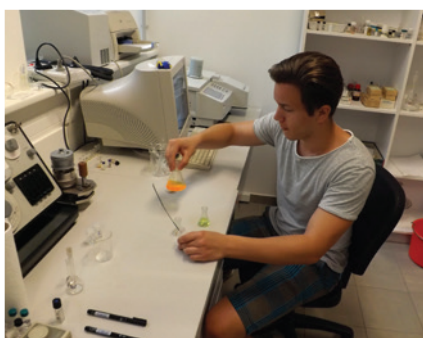
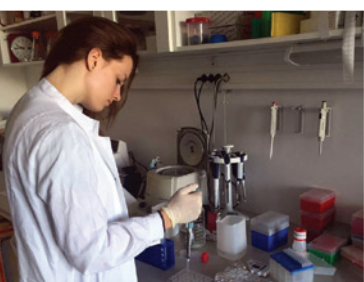
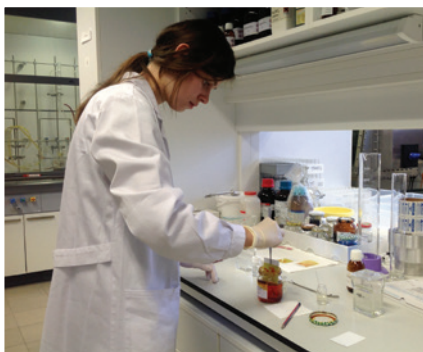
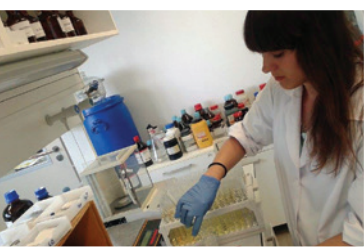
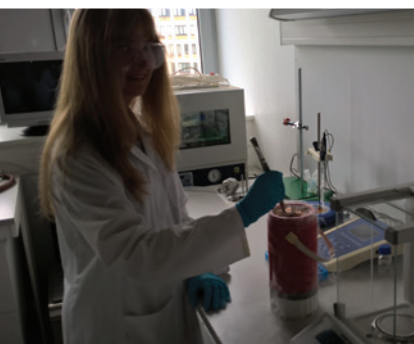
15:57 – 16:20

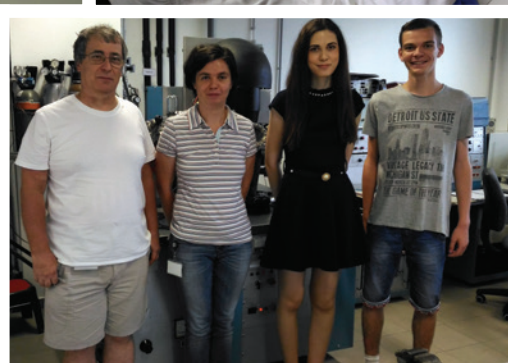
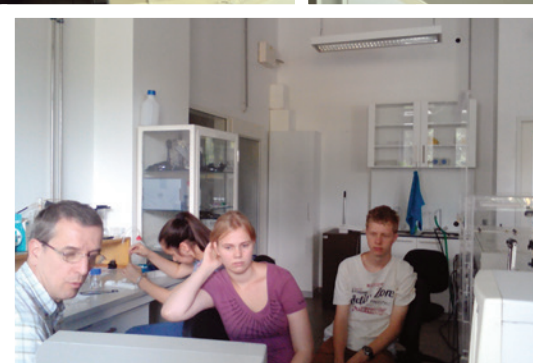
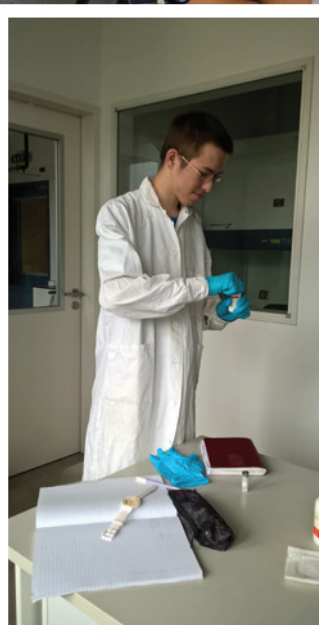
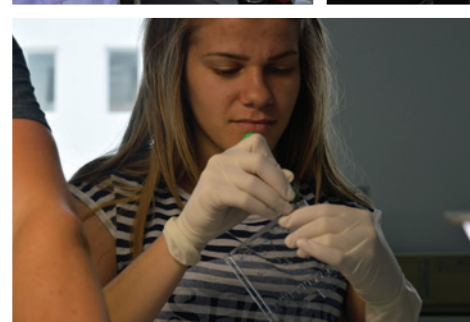
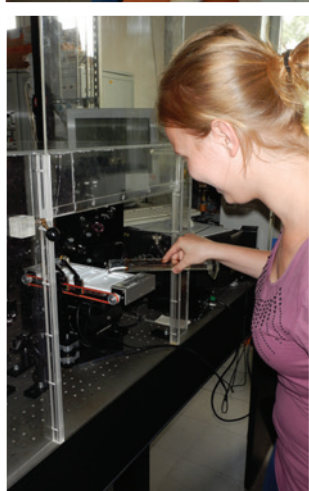
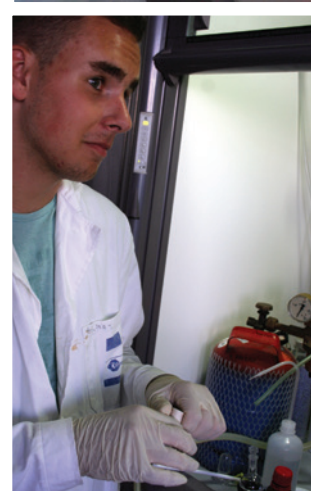
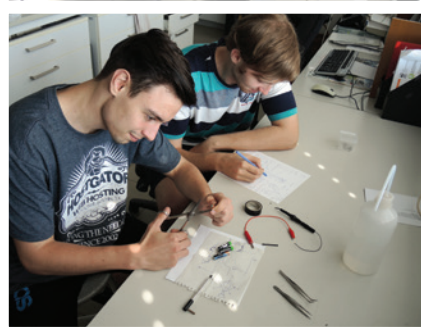
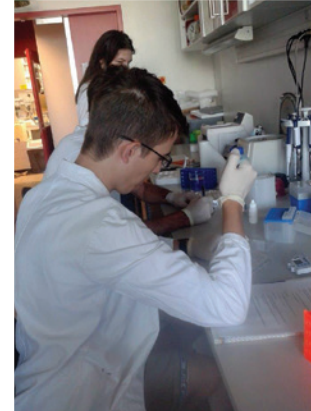
Zárás és értékelés: Tompos András, igazgató, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

16:20 – 17:00

Fogadás a volt és jelenlegi kutatótáborozó Diákok, Témavezetőik és Vendégeink részére

6 LABORMUNKÁBAN





7 LABORLÁTOGATÁS



8 DOLGOZATOK

A DNS replikációban kulcsszerepet játszó PCNA fehérje kifejezése *E. Coli* expressziós rendszerben

Csiszer Mónika

Márton Áron Főgimnázium, Csíkszereda, Románia

Kós Tamás

Eötvös József Gimnázium, Budapest

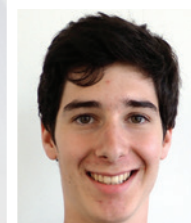
Polgár Patrik

Keszthelyi Vajda János Gimnázium, Keszthely

témavezetők:

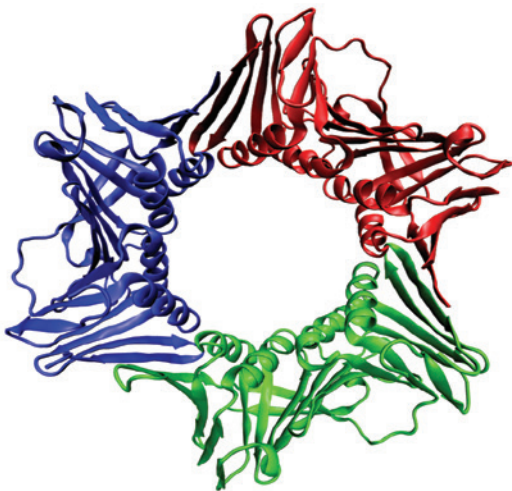
Dr. Szeltner Zoltán és Póti Ádám

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet



Bevezetés

Az AKI Kíváncsi Kémikus Kutatótábor szervezésében egy egyhetes kutatómunkában vettünk részt az MTA Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézetében Szeltner Zoltán és Póti Ádám témavezetésével, akik nemcsak szakmai ismereteket adtak át, hanem kedvességükkel és humorukkal élveztessé is tették a munkát. A témaírást olvasva azért választottuk ezt a témát, mert nagy kihívásnak tűnt a kitűzött feladat, ami különböző típusú PCNA fehérjék előállítása és ezek expresszálása volt *E. Coli* baktérium rendszerben.



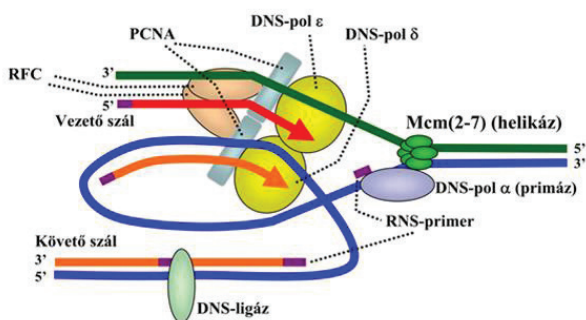
1. ábra A PCNA szerkezete

Elméleti háttér

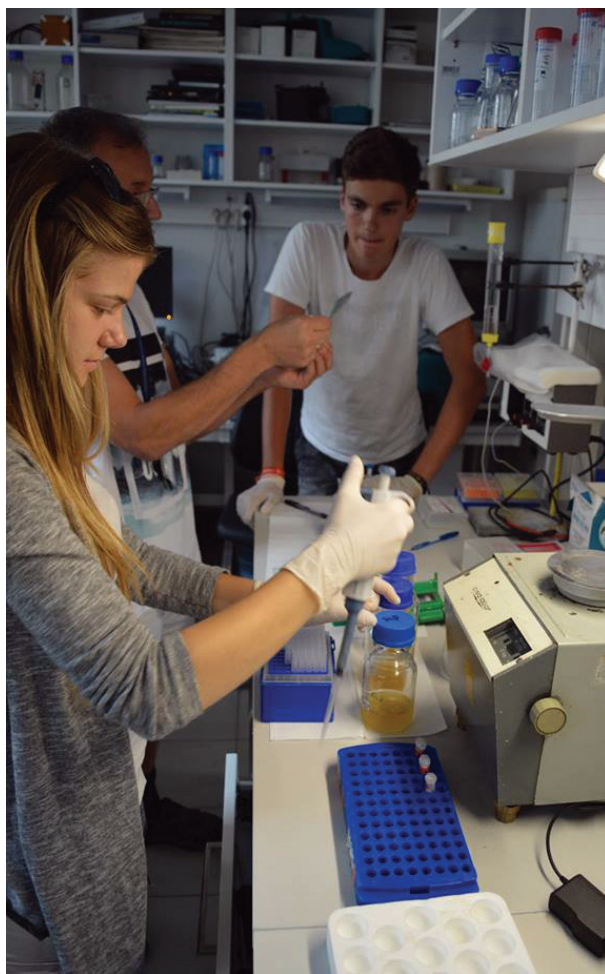
Megismerkedtünk a PCNA szerkezetével (1. ábra) és biológiai szerepével (2. ábra). A PCNA egy trimer, 3 alegységből felépülő protein, a sejtek osztódását megelőző DNS megkettőződés (replikáció) egyik kulcsmolekulája. A PCNA fehérjének igen fontos szerepe van a DNS sérülések (léziók) detektálásában is. Ilyen lézió például az UV fény hatására létrejött ciklobután pirimidin dimer, ami gyakran alakul ki timin bázisok között (T^T), és aminek jelenléte a replikációs villa elakadásához vezet. A PCNA 164-es lizinje ekkor ubikvitinálódik, ami transzléziós (TLS) polimerázokat vonz magához, amelyek nukleotidokat tudnak beszúrni a lézióval szemben, ezáltal folytatódhat a DNS átírása.

A DNS replikációját sejten kívül (in vitro) is vizsgálják ebben a laboratóriumban, amelyhez szükség van fontos fehérje faktorokkal rendelkező sejtextraktokra, olyan plazmid DNS-re, ami DNS-léziókat tartalmaz, dezoxi-nukleotid-trifoszfátokra, T-antigénre, ami a replikáció elindítását végzi, valamint ATP-re, ami az energiát szolgáltatja a folyamathoz.

Háromféle PCNA variánst állítottunk elő: (i) vad típusú PCNA-t, amely az extraktban ubikvitinálódhat a 164-es lizinjén, és ezáltal képes lehet TLS-re, (ii) PCNA K164R mutánst, amely TLS képtelen, hiszen a 164. helyen lévő lizin helyett arginint tartalmaz és (iii) egy ubikvitin fehérje todatot kódoló mutánst



2. ábra A PCNA biológiai szerepe



3. ábra Részvételünk a munkában



4. ábra A telepek kinőttek

(PCNA-Ub fúzió), amely maximálisan TLS képes, ugyanis egy fehérjéhez csatolt ubikvitint tartalmaz.

Engem lenyűgözött az egész labormunka. Nekem az tetszett a legjobban, hogy néhány veszélyesebb anyaggal is dolgozhattunk, nagyon sok eszközzel és folyamattal ismerkedhettünk meg, amit a jövőben hasznosíthatunk is akár. - Csiszer Mónika

Részvételünk a kutatásban (3. ábra)

Röviden összefoglalva laborfeladatunk két részre osztható. Részt vettünk a DNS- és a fehérjemunkában. A DNS munka a PCNA K164R mutáció beviteléből állt Quick Change mutagenézissel. A fehérjemunka több szakaszra osztható. Először *E. Coli* baktériumba juttattuk a PCNA-variánsok génjeit (expressziós plazmidba klónozva), ezáltal az általunk kiválasztott fehérje variánsokat megtermeltethettük ezekkel a baktériumokkal. Ezután mintákat vettünk a különböző kultúrákból, és azokat feltárva, majd SDS poliakrilamid gélen megfuttatva egy különleges festési eljárással bizonyítottuk fehérjeink kifejeződését.

Az MTA-nál eltöltött egy hét alatt rengeteg eszközzel és módszerrel ismerkedtünk meg, és közelebb kerültünk a molekuláris biológia megértéséhez is. Bár munkánk elméleti háttérét tartottam a legizgalmasabbnak, a gyakorlati feladatok között is voltak nagyon látványosak, például a fehérjék ezüsfestése. – Kós Tamás

A PCNA K164R mutáció beviteléhez Quick Change mutagenézist alkalmaztunk. Az eljárás lényege az, hogy egy olyan elegyet állítunk össze, amely tartalmazza az eredeti DNS-t, és a K164R mutációt tartalmazó DNS-szakaszt („forward”- és „reverse” primereket), a megfelelő reakciókörülményeket biztosító puffert, dezoxinukleotid trifoszfát keveréket és pFu turbo polimerázt. Az elegy létrehozása után indítottuk el a 15 ciklusos, ciklusonként 3 fázisból álló PCR („polymerase chain reaction”) reakciót. Az első fázisban (denaturáció) magas hőmérsékleten denaturlódott a DNS, azaz szálai szétváltak. Így az alacsonyabb hőmérsékletű második fázisban (anelláció) a mutációt tartalmazó DNS-darabok hozzá tudtak kötődni az eredeti DNS-hez. A harmadik fázisban (polimerizáció) a polimeráz már nemcsak az eredeti, hanem a mutáns DNS-t is elkezdte szintetizálni. A reakció végén tehát egy olyan elegyet kaptunk, amely az eredeti és a mutáns DNS-szakaszokat is tartalmazó vektorokból áll.

Az eredeti DNS-eket egy Dpn I nevezetű enzimmel tudjuk lebontani, ugyanis ezek metilált templátok voltak. Az emésztésen átesett mintát ezután *E. Coli* kompetens sejtekbe ültettük (transzformáltuk), majd az eljárás végén a baktériumokat ampicillines

lemezre kentük ki. A DNS-t felvett baktériumok telepet tudtak formálni a lemezen, mivel a plazmid-DNS olyan enzimet (béta laktamáz) is kódol, ami lebontja az ampicillint. Néhány kiválasztott telep felszaporítása után azokból DNS-t izoláltunk, és restrikciós emésztéssel ellenőriztük, hogy a PCNA inzertje megtalálható-e bennük. Két olyan enzimmel vágtuk el a DNS-t, amelyek pont a PCNA-t kódoló szakasz két végén hasítanak. Ennek a szakasznak a méretét kilo bázispárban (kbp) állapíthattuk meg etidium-bromidot tartalmazó gélen való futtatás után UV fényben való detektálás segítségével. Így sikerült bizonyítani a szakasz jelenlétét a vektorban. Később a mutáció jelenlétét is bizonyíthatjuk szekvenálással.

Rendkívül érdekes volt számomra ennek a folyamatnak a megismerése, különösen az, hogy milyen könnyen, viszonylag hétköznapi laboratóriumi eszközökkel és anyagokkal alakíthatjuk át a baktériumok DNS-ét. Megtanulhattuk, hogyan kell gélt önteni, hogyan kell benne restrikciós emésztést követően a kivágott DNS-szakasz hosszát megállapítani. Sokat ügyeskedtünk a minta felvételével a gélbe, de néhány próbálkozás után már sikerült. –

Kós Tamás

A fehérjemunkánk során a PCNA K164R és a PCNA-Ub fehérjéket expresszáltuk. A fehérjék kifejeződéséhez a klónok DNS-eit transzformáltuk *E. Coli* baktériumsejtekbe. Ezután az ampicillines lemezeket egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk, amelynek hatására a plazmidot felvett baktériumok telepei kinőttek (4. ábra). 1-1 telepet ampicillines táptalajba oltottuk, majd növesztettük őket. Egy IPTG nevű vegyülettel segítettük elő a fehérjék termelődését, reggelig növesztettük a telepeket 27°C-on. Ezt követően 1-1 ml- es mintákat vettünk, majd a mintákat lecentrifugáltuk. A baktériumokat ultrahanggal feltártuk („szonikálás”), majd centrifugálással különválasztottuk őket oldható és nem oldható frakciókra. Ezután SDS-t (nátrium-dodecil-szulfátot) és DTT-t (1,4-dimerkapto-2,3-butándiolt) is tartalmazó puffert (mintakotélt) adtunk az így elkészült mintákhoz, amelyek kitekerik a fehérjék láncait, valamint megszüntetik a diszulfid hidakat. A fehérjék denaturációját a minták 95 °C-on 5 percig történő hőkezelésével is elősegítettük.

Gyakorlati módszerek

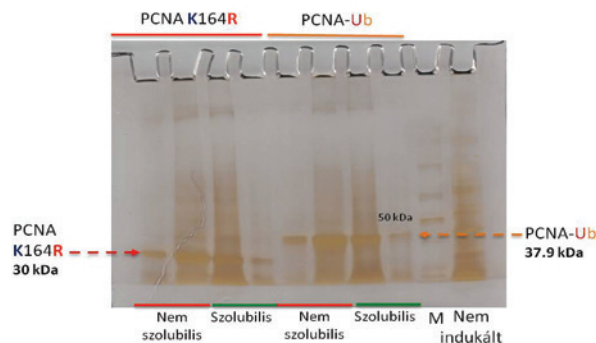
SDS poliakrilamid gélelektroforézis

Az SDS az a vegyület, amely kitekeri a fehérjéket, és egységesen negatív töltésűvé teszi őket. Az SDS gél-elektroforézis lényege, hogy a fehérjék molekulatömegük szerint válnak el a poliakrilamid gélen.

A gélington berendezésen 15%-os géleket készítettünk, amelyek közül az egyik sajnos megsérült, a másik pedig kifolyt. Két géltre vittük fel a mintákat: az egyik a mi sérült „házi” gélünk volt, a másik pedig egy gyári gél. Felvittük mind a nem oldható (az 5. ábrán inszolubilis), mind az oldható (szolubilis) frakciók mintáit hígán és 10-szeres töménységben egyaránt. Kontrollként molekulatömeg-standardot használtunk, melyet a 9. zsebbe injektáltunk (az 5. ábrán az M jelű minta). Ezután rákapcsoltuk a feszültséget a rendszerre, 100 V-on futtattuk a gélt. Miután a gél szépen lefutott, következett munkánk gyümölcsének learatása: a baktériumok által megtermelt fehérjék láthatóvá tétele.

Ezüstfestési eljárás

Ezt egy ún. ezüstfestési eljárással végeztük, ugyanis a fehérjék képesek ezüstöt megkötni, s ez a megkötés redukáló környezetben felerősíthető. Az ezüst-nitrát oldatból a fehérjékre barna fém-ezüst kolloid csapód-



5. ábra Munkánk gyümölcse

dik le. (5. ábra)

Munkánk összefoglalása

A TLS (transzlációs polimeráz) in vitro kísérletekben való tanulmányozására egy mutáns PCNA klónt (PCNA K164R) készítettünk Quick Change mutagenézis alkalmazásával úgy, hogy a fehérje 164. aminosavát (lizint) kódoló tripletet (AAA) arginint kódoló tripletté (AGA) alakítottuk át. Ezután sikeresen kifejeztük a mutáns fehérjénket, illetve egy másik mutáns fehérjét is (PCNA-Ub) *E. Coli* expressziós rendszerben. A fehérjék termelődését SDS gélelektroforézissel és ezüst festési eljárás alkalmazásával mutattuk ki.

Nekem személy szerint az tetszett a legjobban, hogy a hét folyamán az elméleti háttér és a gyakorlati alapokat felváltva sajátítottuk el: miután megismerkedtünk az ezüstfestési eljárás elméleti hátterével, egyből el is végeztük vele a fehérjék vizualizálását. A gél szkennelését követően elének tárult munkánk gyümölcse, mely fantasztikus érzés volt. – Polgár Patrik

Fluoreszcens fehérjék vizsgálata sejtekben

Németh Virág Alexandra

Lovassy László Gimnázium, Veszprém

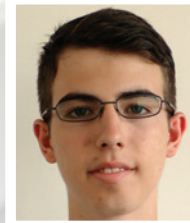
Ótott Péter

Szegedi Radnóti Miklós Kísérleti Gimnázium

émavezetők:

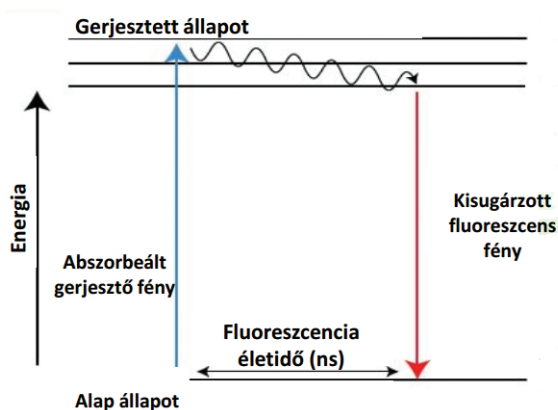
Besztercei Balázs és Baksa Attila

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet



Bevezetés

Az MTA Természettudományi Kutatóközpont táborában töltöttünk el egy hetet, amikor is lehetőségünk volt fluoreszcens fehérjéket vizsgálni emlős sejtekben konfokális mikroszkóp felhasználásával. Először zöld fluoreszcens fehérjéhez kapcsolt fehérjeszakaszt kódoló plazmidot szaporítottunk fel baktériumsejtekben, melyet azután izoláltunk, és egér idegsejtekbe jutattunk be. A sejtekben a fúziós fehérjéink a plazmidról kifejeződtek, így vizsgálni tudtuk őket fluoreszcens mikroszkópiával. Foglalkoztunk még immuncitokémiával, melynek során sejtekben tudtunk fehérjéket azonosítani, és azok elhelyezkedését vizsgálni. Munkánkban nagy előnyt jelentett, hogy lehetőségünk volt konfokális mikroszkópot használni, mellyel nagyobb felbontású képeket kaptunk a sejtekről.



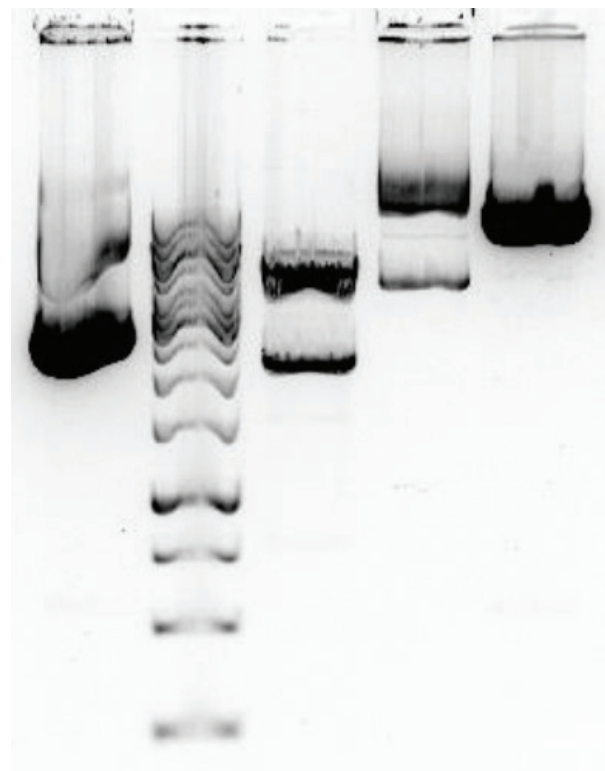
1. ábra Fluoreszcencia jelensége

Kísérleti rész

A fluoreszcencia az a jelenség, amelynek során egy anyagot/molekulát egy bizonyos hullámhosszú fénnel megvilágítva („gerjesztve”) az egy másik, nagyobb hullámhosszú fényt bocsát ki (1. ábra). Ezt a jelenséget fel lehet használni asejtbiológiában is. Például fluoreszcens fehérjékhez kapcsolt fehérje vagy fehérjeszakaszt ki lehet fejezni sejtekben, így azok láthatóvá válnak fluoreszcens mikroszkóppal. Így meg tudjuk állapítani a sejtben a vizsgálni kívánt fehérje mozgását, elhelyezkedését (pl. magban, citoplazmában vagy membránban). A laborban rendelkezésünkre állt több fehérje, illetve azok egy részét (Grp1 és Akt PH doménjeit) hordozó plazmid, mely a vizsgálandó fehérjét kódoló rész mellett a „zöld fluoreszcens fehérje” (GFP: green fluorescent protein) génjét is tartalmazta. Ennek hatására a plazmidról az emlős sejtekben olyan fehérje fejeződik ki (expresszálódik), melyben a fehérjénkhez fuzionálva van a fluoreszcens GFP is. Tulajdonképpen a fuzionáltatott GFP teszi láthatóvá a vizsgálni kívánt fehérjénket a sejtekben. A plazmidokat először baktériumsejtekben felszaporítottuk, hogy elegendő mennyiségű plazmid álljon rendelkezésünkre a transzfekcióhoz. Ennek során először „hősokk” segítségével bejuttattuk a plazmidot a baktériumsejtekbe („transzformáció”), majd a sejteket antibiotikumot tartalmazó agar táptalajon növesztve kisselektáltuk közülük azokat, amelyek hordozzák a plazmidot. A plazmidok antibiotikum rezisztencia gént hordoznak, ez teszi lehetővé a szelekciót. A kisselektált sejteket ezután tápoldatban felszaporítottuk, ebben az esetben

az utódsejtek is hordozzák a plazmidokat. Ezután a baktérium sejtekből ún. „plazmid tisztító kit” segítségével izoláltuk a plazmidot. Végeredményként a plazmidot tisztán, mindenféle egyéb szennyeződéstől mentesen tartalmazó oldatot kaptunk.

Agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, hogy a plazmid tartalmazza-e a vizsgálandó fehérje DNS szakaszát. Első lépésben speciális emésztőenzimek (restrikciós endonukleázok) segítségével emésztettük a plazmidot, majd az emésztett mintákat agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk. A gélelektroforézis módszere alkalmas arra, hogy DNS/RNS mintákat egy elektromos erőterbe helyezve méretük alapján elválasszuk egymástól. 1%-os agaróz gélre öntöttünk a futtató kádba, majd a gél zsebeibe vittük a mintáinkat, illetve a DNS létrát, melyhez viszonyítottuk a futtatott minták méreteit. A kád két végére feszültséget kapcsolunk, melynek hatására a negatív töltéssel rendelkező plazmid DNS-ek a pozitív pólus felé mozogtak. Így végül a különböző méretű emésztett plazmid darabok különböző helyen jelentek meg (2. ábra).



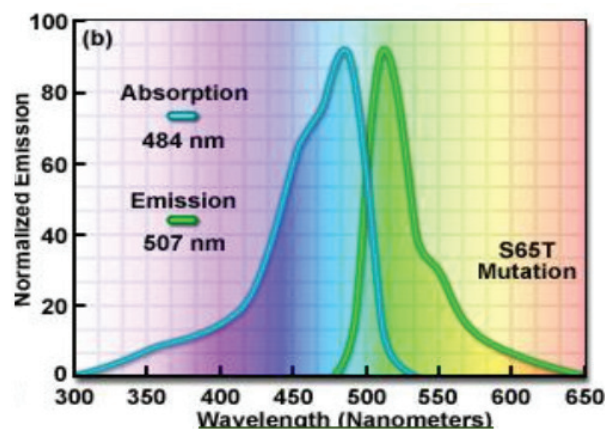
2. ábra Gélelektrofézis eredménye

Az expressziós kísérleteinkben a fluoreszcens fehérjéhez kapcsolt fehérje szakaszt kódoló plazmidot egér idegsejtekbe (Neuro2a neuroblasztóma sejtvonal) juttattuk. Ezt a folyamatot transzfekciónak nevezzük, melynek során a plazmid DNS-t transzfekciós reagens segítségével juttatjuk be a sejtekbe. A transzfekciós reagens egy liposzómális rendszer, ami tulajdonképpen a bejuttatni kívánt DNS-t „becsomagolja” egy lipid burokba. Ez a lipid burok „olvad össze” a sejtek membránjával, és így kerül be a plazmid DNS a sejtekbe. Ezután a sejteket 37 °C-on, 5 %-os CO₂ tartalmú levegőben 48 órán át inkubáltuk, ez idő alatt termelődtek a fehérjék a sejtekben (3., 4. ábra).

Az expresszált fehérjék kifejeződésének/lokalizációjának vizsgálatához konfokális mikroszkópot használtunk, mely fluoreszcensen jelölt fehérjék vizsgálatára alkalmas. A konfokális mikroszkóp képalkotása abban tér el a hagyományos fluoreszcens mikroszkóptól, hogy egy úgynevezett konfokális pinhole segítségével a mintáról érkező fény csak a fókusz síkból kerül a detektorba. A fókusz sík alatt és felett lévő területről a fény nem jut el oda. A módszer segítségével nagyobb felbontású képet kapunk a hagyományos fluoreszcens mikroszkópokhoz képest. Bizonyíték erre, hogy ha a pinhole-t teljesen kinyitjuk, nem szűrünk ki semmit a fókusz síkon kívüli fényből, ezáltal kisebb felbontású képet (ún. „widefield” képet) kapunk. Nagyon látványos volt, amikor a rétegfelvételekből



3. ábra A felhasznált plazmid térképe



4. ábra A fluoreszcens fehérje fényelnyelési (abszorpció) és kisugárzási (emissziós) spektruma

több 10 felvételképet egymásra rakva készítettünk egy „Z-stack” felvételt, amely egy 3 dimenziós kép a sejtekről. Készítettünk ún. „tilescan” képet is, ilyenkor a mintáról egy nagy látóterű képet kapunk (5., 6. ábra).

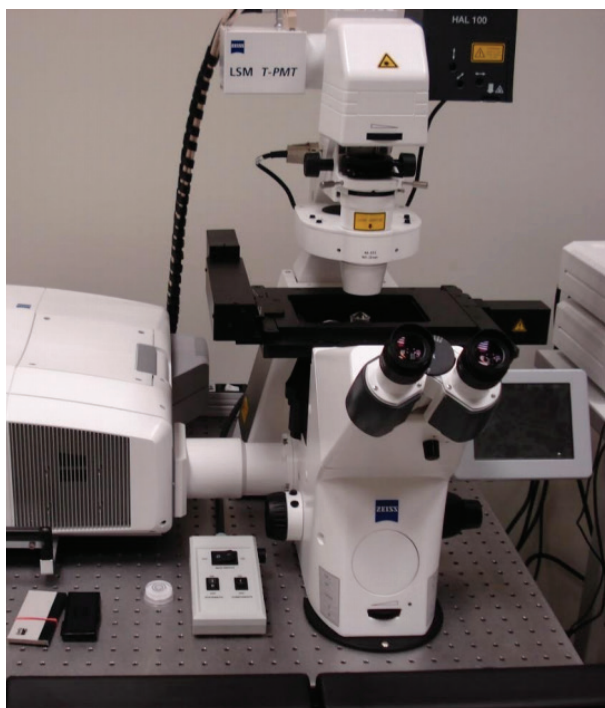
A nem-GFP-fúzionált fehérjék vizsgálatára használt módszerek egyike az immuncitokémia volt, mely az antigén-antitest kölcsönhatás jelenségét veszi alapul, és a fehérjék specifikus kimutatására és lokalizálására alkalmas. Az eljáráshoz fluorofórokra, vagyis olyan molekulákra van szükség, melyek alkalmasak fluoreszcens fény kibocsátására. A módszer első lépése a sejtek fixálása, permeabilizálása, valamint blokkolása. Ezután a vizsgálni kívánt fehérjéhez egy ún. elsőleges antitestet kapcsolunk,

ezt követően pedig ahhoz egy másodlagosat, amely tartalmazza a fluorofórt. Ez az, amit később detektálni tudunk (7., 8. ábra).

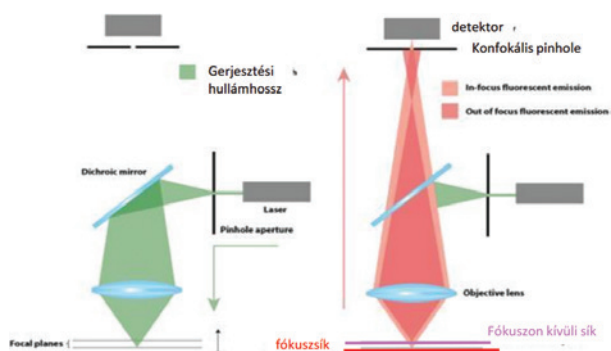
A mikroszkópos vizsgálatok során 488 nm-es hullámhosszú lézert fényel világítottuk meg a sejteket, és 500 és 550 nm között detektáltuk a kibocsátott fényt. Igazán érdekes volt számunkra, hogy többféle festékanyagot használva a sejt különböző alkotóit akár külön-külön is láthatóvá tudtuk tenni.

Köszönetnyilvánítás

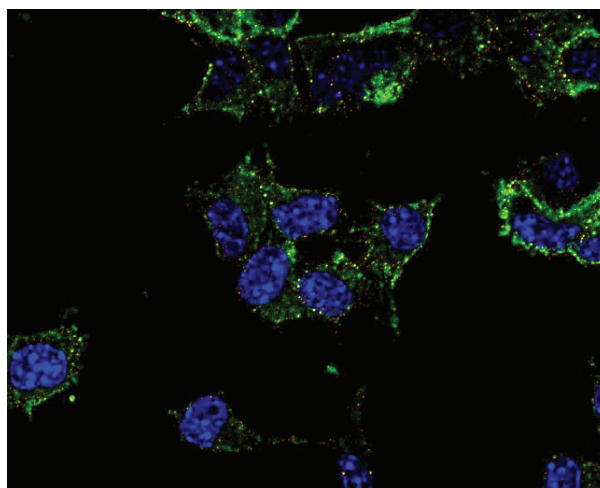
Köszönjük szépen a segítséget témavezetőinknek, Besztercei Baláznak és Baksa Attilának. Köszönjük a tábor lebonyolítását Lendvayné Győrik Gabriellának, illetve az MTA TTK munkatársainak.



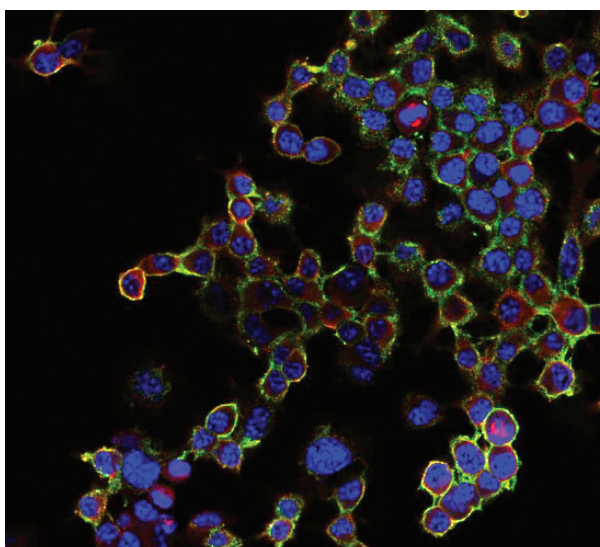
5. ábra Konfokális mikroszkóp



6. ábra A konfokális mikroszkóp működési elve



7. ábra Az immuncitokémia eredménye (Z-stack) -
kék szín: magfestés; zöld szín: PH domén



8. ábra Az immuncitokémia eredménye (Tile scan)-
kék szín: sejtmag; zöld szín: membrán; piros szín: citoplazma

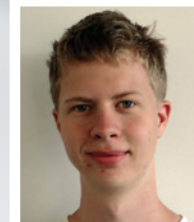
Hogyan épül fel a sejtmembrán? - Egyszerű modellek előállítása és vizsgálata

Balbisi Mirjam

Jedlik Ányos Gimnázium, Budapest

Marozsák Tóbiás

Óbudai Árpád Gimnázium, Budapest



émavezetők:

Dr. Keszthelyi Tamás és Dr. Mihály Judith

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

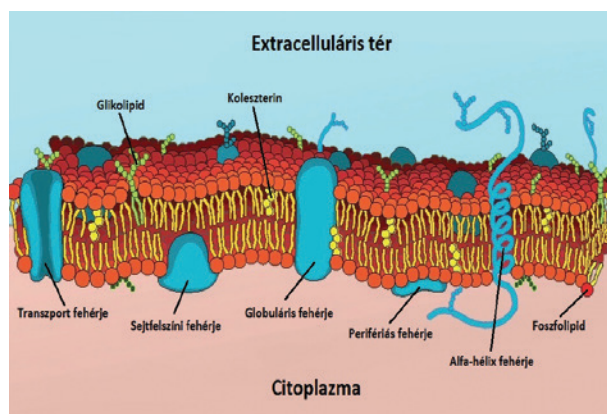
Bevezetés

Testünk legkisebb egységei a sejtek, amelyek funkciója rendkívül sokoldalú, egy-egy sejtben párhuzamosan akár több ezer biokémiai reakció is végbemehet. Ennyi reakció egyszerre történő lejátsszódásához egymástól elkülönülő reakcióterekre van szükség, melyek elválasztása membránok által valósul meg. A sejteket kívülről szintén biológiai membrán, a sejthártya borítja. A sejtmembrán, hasonlóan a sejtben belüli membránokhoz, több feladatot is ellát: egyrészt a sejt belseje (citoplazma) és a külső környezet (extracelluláris tér) elhatárolásáért felelős, másrészt az azok közötti anyagforgalmat teszi lehetővé a beépült transzportfehérjék révén. További funkciója, hogy jelölőfehérjék révén azonosíthatóvá teszi a sejtet, a receptorfehérjék pedig a külvilágból érkező, a sejt szabályozásához szükséges jeleket fogadják.

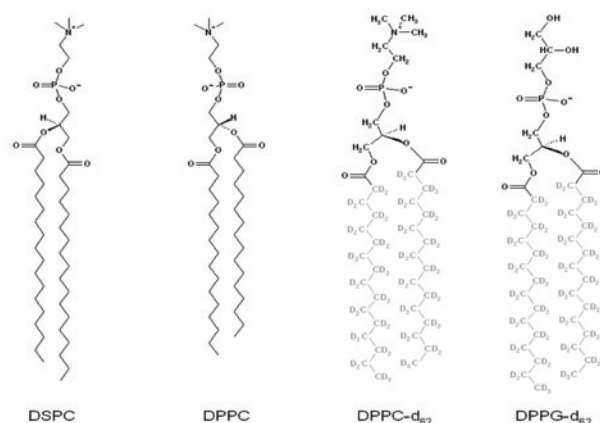
Sejtmembrán modellek

A sejtmembrán alapját képező foszfolipidek jelentős szerephez jutnak a gyógyszerkutatásban. Liposzómás rendszerek alkalmazása például a hatóanyag célzott bejuttatását teszi lehetővé a szervezetbe. Munkánk során a sejthártyát kétdimenziós foszfolipid kettősréteggel modelleztük. A sejtmembrán felépítése természetesen ennél összetettebb, többek között a rétegbe beépült fehérjék miatt, de az általunk elkészített egyszerű modellnél ettől eltekintettünk. A foszfolipidek olyan makromolekulák, amelyekben a glicerint két karbonsav és egy foszforsav észteresíti. Kettősréteg kialakítására amfipatikus jellegük miatt képesek: az apoláris, hidrofób oldalláncok egymás felé fordulnak, míg a poláris, hidrofíli fejcsoportok a vizes fázis felé mutatnak.

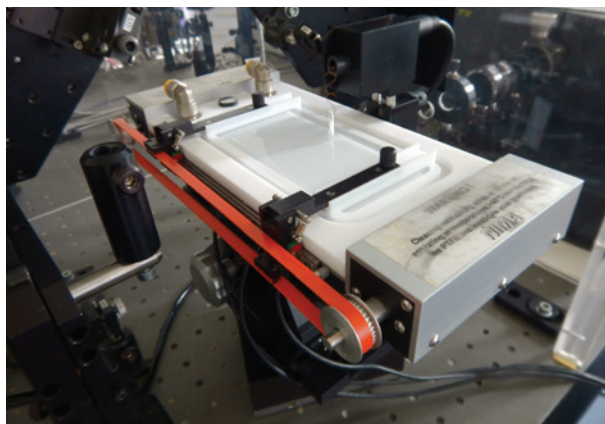
Munkánk során kutatótársunkkal, Felföldi Lucával



1. ábra A sejtmembrán felépítése



2. ábra Foszfolipidek szerkezeti képlete



3. ábra Langmuir filmmérleg

közösen négy féle lipiddel dolgoztunk, ezek a következők: a DSPC (Disztearoil-foszfadil-kolin), a DPPC (Dipalmitoil-foszfadil-kolin), a DPPC-d62 (Deuterált dipalmitoil-foszfadil-kolin), illetve a DPPG-d62 (Deuterált dipalmitoil-foszfadil-glicerin). A megfelelő szerkezeti képleteket a 2. ábra mutatja. A DPPC-d62, illetve a DPPG-d62 lipidek nevében a d62 arra utal, hogy az alkiláncokban a próciumatomokat azokkal gyakorlatilag mindenben azonos tulajdonságú, de eltérő atomtömegű deutériumatomok helyettesítik.

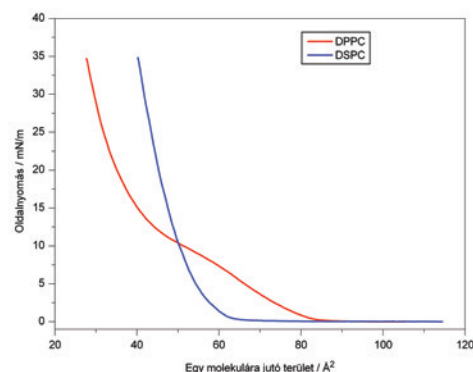
Langmuir-filmmérleg

A mono- és kettősrétegek készítésében és azok részleges vizsgálatában a Langmuir-filmmérleg volt segítségünk, mely a 3. ábrán látható.

A filmmérleg fő egysége egy kétszer desztillált vízzel feltöltött teflonkád, amelyre két gát fekszik rá. Ezek távolságának csökkentésével nyomható össze a vízfelszíni lipidréteg. Az erőmérő a vízbe merülő ún. Wilhelmy-lemez közvetítésével az oldalnyomás mérése szolgál. Definíció szerint az oldalnyomás nem más, mint a tiszta vízfelszín felületi feszültségének és a felületaktív anyag felvitele utáni felületi feszültségének a különbsége. A lipideket kis koncentrációjú kloroformos oldatuk formájában fecskendővel jutattuk a vízfelszínre.

Izoterma

A foszfolipidek felületaktív anyagok lévén megváltoztatják a felületi feszültséget. Ennél fogva az izoterma – amely az oldalnyomást (mN/m) az egy molekulára jutó terület ($\text{\AA}^2/\text{molekula}$) függvényében ábrázoló görbe – alkalmas azok vízfelszíni monorétegének jellemzésére. Munkánk során a DSPC és a DPPC izotermáit vettük fel, ezeket a 4. ábra mutatja.

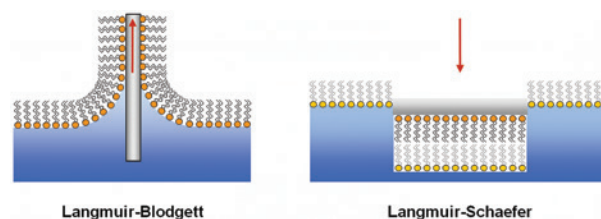


4. ábra DSPC és DPPC monorétegek izotermái

A gátak zárásával csökken a molekulák rendelkezésére álló felület nagysága és így azok rendezettsége nő. Az így kialakuló kétdimenziós lipid réteg állapotai analógiát mutatnak az általánosan ismert, három-dimenzióban tárgyalt halmazállapotokkal. Abban a szakaszban, amelyben az egy molekulára jutó terület nagy, a réteg gáz halmazállapotúnak tekinthető – ekkor még gyakorlatilag semmiféle rendezettséggel nem bír. Az egy molekulára jutó terület csökkentésével a molekulák rendezettsége növekszik, a monoréteg előbb folyékony majd szilárd halmazállapotba jut, amit az oldalnyomás növekedése mutat. A DPPC molekulának két, tulajdonságaikban csak csekély mértékben eltérő folyékony halmazállapota van: az expandált és a rendezettebb kondenzált állapot. Ez magyarázza az izotermáján megjelenő közel vízszintes szakaszt (platót), mivel ekkor e két állapot közötti finom átmenet zajlik le az oldalnyomás vártnál kisebb megváltozásával.

Szilárd hordozós mono- és kettősrétegek előállítása

A vízfelszíni monoréteg vizsgálata után a lipidréteget szilárd hordozóra (kvarc prizmára, illetve CaF_2 ablakra és prizmára) vittük át az ún. Langmuir-Blodgett eljárással. A hordozót belemerített-



5. ábra A Langmuir-Blodgett és a Langmuir-Schaefer eljárás

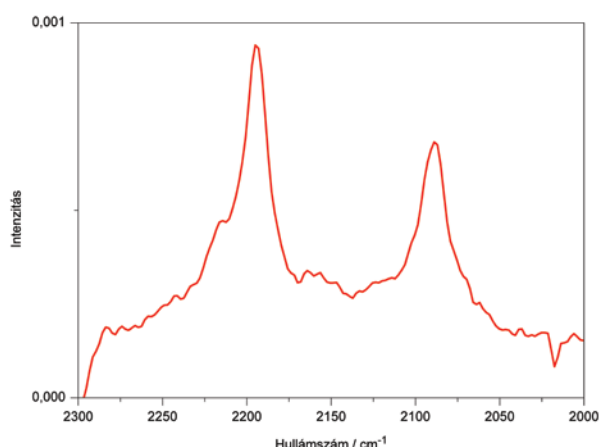
tük a filmmérleg vízzel telt kádjába, majd a lipidek felvitelét követően alkalmas értéken tartott oldalnyomás mellett lassan kiemeltük. A folyamatot az 5. ábra illusztrálja.

A második réteg felvitelére a Langmuir-Schaefer eljárással (lásd 5. ábra) történt. Először egy újabb lipidréteget hoztunk létre a filmmérleg felszínén, majd ehhez lassan közelítve vízszintesen hozzáértettük a monoréteggel előzőleg bevont hordozót. A két lipidréteg találkozásakor kialakul a kívánt kettősréteg, amely a hordozó kiemelésével is megmarad. Ezzel a módszerrel készíthetünk szimmetrikus, illetve aszimmetrikus kettősrétegeket is attól függően, hogy a két lépésben különböző, vagy azonos lipideket használunk.

IR színekép

Az infravörös spektroszkópia egy gyakran használt analitikai módszer egy adott vegyület szerkezetének azonosítására. Az infravörös fénysugárral megvilágított minta bizonyos frekvenciatartományokban több sugárzást nyel el, amely az atomokat nagyobb amplitúdójú molekulán belüli rezgésre készíti. Az elnyelt sugárzás és a gerjesztett molekula-rezgés frekvenciája megegyezik, vagyis a színeképben megjelenő sávokból (amelyek a nagyobb mértékű elnyelődést jelzik) következtethetünk a mintában található atomcsoportokra.

Egy CaF_2 ablakra mint hordozóra felvitt DPPC-d62 monorétegről készítettünk IR színeképet (6. ábra). A $2\,000 - 2\,300\text{ cm}^{-1}$ hullámszám tartományon jellemző két sáv a CD_2 csoportok szimmetrikus és antiszimmetrikus nyújtórezgéseinek felelnek meg. Ezek jelenléte a monoréteg felvitelének sikerességéről tanúskodik.



6. ábra DPPC-d62 monoréteg IR színeképe

Összefrekvencia-keltési spektroszkópia

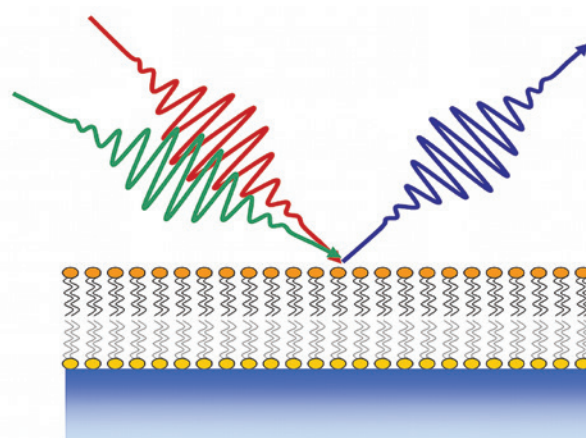
További méréseinket összefrekvencia-keltési (röviden SFG) spektrométerrel végeztük. A mérés elve (7. ábra) a következő: egy változtatható hullámhosszú infravörös és egy változatlan hullámhosszú zöld lézersugarat fókuszálunk a vizsgált minta egy pontjába. A két fénysugár összegződését követően a mintát elhagyó sugárzást detektáljuk. A mérést több hullámhosszon elvégezve kapjuk meg a színeképet, amely ott lesz intenzív, ahol az infravörös sugárzás és egy felszínhez közeli atomcsoport rezgési frekvenciája megegyezik. A módszer sajátossága, hogy csak a határfelületen elhelyezkedő molekulák rezgéséről kapunk képet, mivel a frekvencia-összegzés a tömbi (belső szimmetriával rendelkező) fázisban nem történik meg.

Monoréteg SFG színeképe különböző oldalnyomások mellett

DSPC oldat felhasználásával készített vízfelszíni monoréteget vizsgáltunk különböző oldalnyomás mellett. A felvett SFG színeképek a 8. ábrán láthatóak, amelyek a réteg rendezettségi viszonyairól is információt szolgáltatnak. Az oldalnyomás növekedésével nőtt a réteg rendezettsége (amint azt már az izotermáknál megállapítottuk), és ennek következtében a detektált jel intenzívebb lett. A jelintenzitás növekedéséhez az is hozzájárult, hogy egyben az egységnyi felületre és így a megvilágított pontra jutó molekulák száma is nőtt.

Kettős lipidréteg vizsgálata

A kettősréteg készítésekor a szilárd hordozóra először a Langmuir-Blodgett eljárással egy DSPC monoréteget, majd erre a Langmuir-Schaefer eljárással

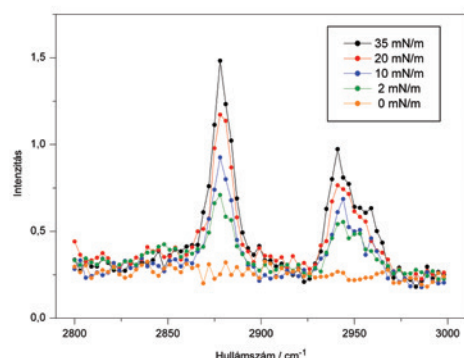


7. ábra Összefrekvencia-keltési spektroszkópia működési elve

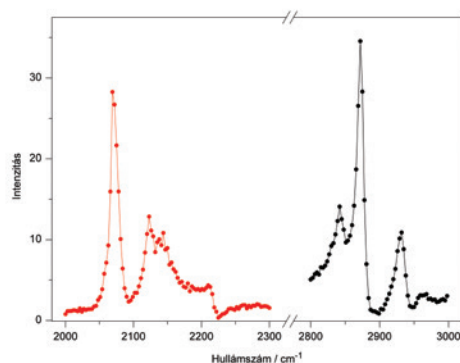
egy DPPC-d62 réteget vittünk fel. Szilárd hordozóként egy kvarc prizmat használtunk. A két különböző foszfolipidból álló kettősréteg nem rendelkezik belső középpontos szimmetriával, így vizsgálható az összegfrekvencia-keltési spektrométerrel. A deuterált DPPC használatával lehetőség nyílt a mérés során a két réteg megkülönböztetésére. A két lipid oldalláncaiban jelen levő CH_3 és CD_3 csoportok nyújtórezgéseinek frekvenciái ugyanis különböznek, és így más hullámszám-tartományon jelentkeznek, ahogyan azt a 9. ábrán látható színekben is megfigyelhetjük. A $2\,000 - 2\,300\text{ cm}^{-1}$ közötti tartományon a DPPC-d62, míg a $2\,800 - 3\,000\text{ cm}^{-1}$ közötti tartományon a DSPC réteg jelenik meg.

CM 15 peptid hatása a DPPG-d62 kettősréteg szerkezetére

A CM 15 peptid egy antimikrobiális peptidet utánozó szintetikus molekula, amely a Cecropin-A és a Melittin bizonyos szegmenseiből épül fel (szám szerint 15 aminosavból, innen az elnevezése). A tábor utolsó napjaiban ennek az anyagnak a hatását vizsgáltuk az egyszerű sejthártya modell szerkezetére. A méréshez DPPG-d62 szimmetrikus kettős réteget vittünk fel CaF_2 prizmára, amelyet egyik oldalról vi-

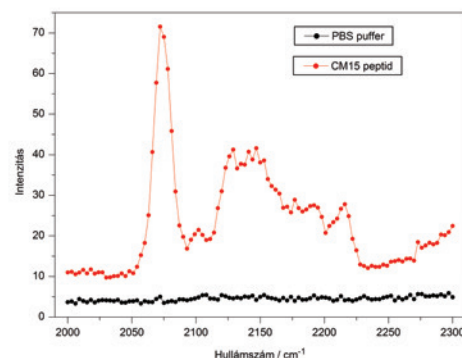


8. ábra DSPC monoréteg SFG színekpei különböző oldalnyomások mellett

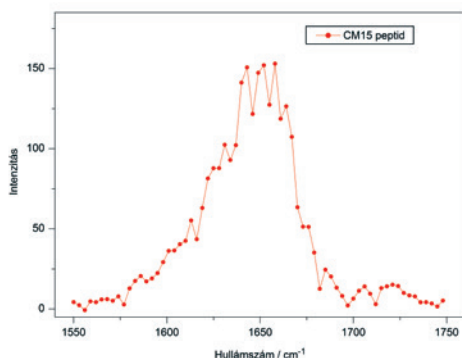


9. ábra DSPC/DPPC-d62 kettősréteg SFG színekpei

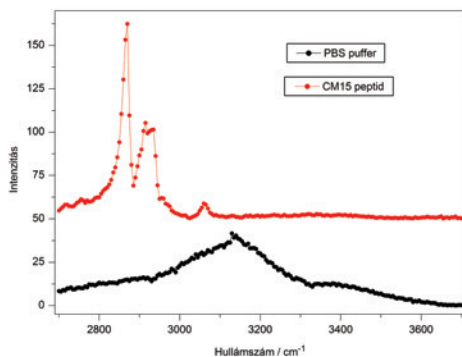
zes fázis (PBS pufferoldat) határolt. A CM 15 peptid oldatának befecskendezését megelőzően és azt követően is SFG színekpeket vettünk fel a kettős rétegről különböző hullámszám tartományokon – ezek láthatóak a 10.a., 10.b. és 10.c. ábrákon.



10.a. ábra DPPG-d62/DPPG-d62 kettősréteg SFG színekpei CM 15 peptid oldatának befecskendezését megelőzően és azt követően; CD_3 és CD_2 csoportok nyújtórezgéseinek tartománya



10.b. ábra DPPG-d62/DPPG-d62 kettősréteg SFG színekpei CM 15 peptid oldatának befecskendezését követően; amid csoport nyújtórezgéseinek tartománya

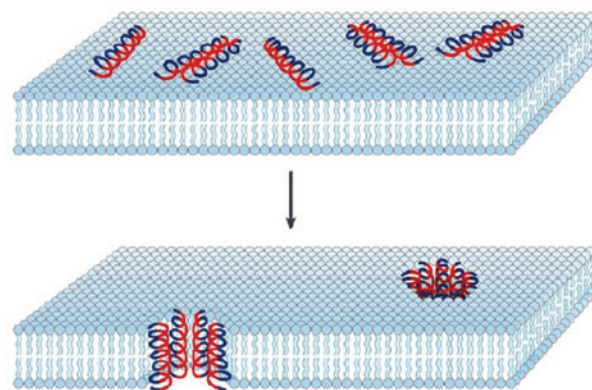


10.c. ábra DPPG-d62/DPPG-d62 kettősréteg SFG színekpei CM 15 peptid oldatának befecskendezését megelőzően és azt követően; CH és OH csoportok nyújtórezgéseinek tartománya

A mérési eredményekből az alábbiak derülnek ki: A CM 15 peptid amid ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) és alkil csoportjaihoz ($2800 - 3100\text{ cm}^{-1}$ között) tartozó rezgési sávok megjelenése a színeképeken a peptid molekulájának felületi rétegben való elhelyezkedéséről árulkodik. A sértetlen kettős réteg belső szimmetriájából adódóan a CD_3 csoportok rezgései az SFG színeképeken nem jelentek meg. A CD_3 csoportok rezgéseinek a CM 15 peptid oldat befecskendezését követő detektálása tehát azt mutatja, hogy a peptid valamilyen módon megbontotta a kettős réteg szimmetriáját. Ennek mechanizmusa a mai napig tisztázatlan, többféle elképzelés létezik. Ezek egyike a „barrel-stave” modell, amelyben a peptid hélixek egy köteget alkotva ágyazódnak be a lipid kettősrétegbe arra merőlegesen, hidrofób részekkel a lipid felé, hidrofíl részeikkel pedig a köteg belseje felé fordulva. Így a rétegen egy átjárható rés alakul ki (11. ábra).

Összefoglalás, köszönet

A tábor során Langmuir-fimmérleg segítségével létrehoztunk vízfelszíni monorétegeket, majd azokat szilárd hordozóra vittük fel mono- és kettősrétegeket állítva elő. A vízfelszíni monorétegről izotermát készítettünk, a szilárd hordozós rétegeket pedig infravörös és összegfrekvencia-keltési spektroszkópiával vizsgáltuk. Végül azzal a kérdéssel foglalkoztunk, hogy egy antimikrobiális peptid milyen hatással van egy kettősréteg szerkezetére. Összegzésként elmondhatjuk, hogy a tábor egy hete során



11. ábra A „barrel-stave” modell

rengeteg új ismeretet szereztünk, sok általunk eddig nem ismert mérőműszerrel dolgoztunk, és bepillantást nyertünk a kutatói élet mindennapjaiba. Úgy gondoljuk, hogy az itt megszerzett tapasztalatok később is hasznunkra lehetnek.

A táborban megszerzett ismeretekért, tapasztalatokért és a felejthetetlen élményért köszönet illeti témavezetőinket, Mihály Juditot és Keszthelyi Tamást, akik a hét folyamán segítettek minket és bevezettek a kutatás világába. A tábor szervezőinek köszönjük, hogy idén is megszervezték a tábort. Szeretnénk külön köszönetet mondani Lendvayné Győrik Gabriellának, akinek az áldozatos munkája nélkül nem jöhetett volna létre ez a tábor.

Gyógyszermolekula tervezése számítógép segítségével

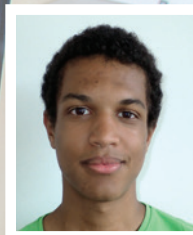
Nyariki Noel

Berzsenyi Dániel Gimnázium, Budapest

émavezetők:

Bajusz Dávid és Kiss Dóra Judit

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet



Bevezetés

Napjainkban gyakran találkozunk gyógyszerekkel: vannak, akik már kisebb fejfájás esetén is rögtön a gyógyszeres dobozban keresik a megoldást, míg mások inkább próbálnak külső behatások nélkül boldogulni betegségük átvészelése során. Régebben hosszas próbálgatás és kísérletezés után tudtak az emberek gyógyszereket találni, ám a XX. században megjelentek a számítógépek, melyek idővel alkalmassá váltak bonyolult matematikai műveletek gyors elvégzésére, és így a gyógyszertervezés fejlődésében is nagy szerepük volt, és van.

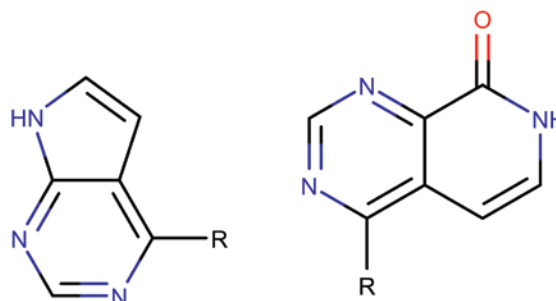
A kutatás célja

A kutatásaink során számítógép segítségével olyan szerves molekulákat (ligandumokat) kerestünk, amelyek képesek gátolni a Janus-kináz 1 (JAK1), illetve Janus-kináz 2 (JAK2) nevű fehérjék működését. Ezen óriásmolekulák túlműködése áll fenn bizonyos immunológiai betegségek esetén, és gátlással javítható a beteg állapota. A gátlás egy külső forrásból – jelen esetben gyógyszerből – származó inhibitorral, azaz gátlószertel történik. Ha a fehérje-inhibitor-komplex kialakulását egyensúlyi folyamatként értelmezzük, akkor a K egyensúlyi állandó képes arról képet adni, hogy milyen mértékben kötődik az inhibitor a fehérjéhez. Minél nagyobb ez az érték – illetve minél kisebb ennek reciproka, a K_d disszociációs állandó –, annál jobban kötődik az adott anyag (jelen esetben az inhibitor) a fehérjéhez. Mivel az ATP és a gátlószert „versenyeznek” a fehérjemolekulák kötőhelyeiért, így egy nagyobb affinitású (kisebb K_d) ligandum hatékonyabban tud-

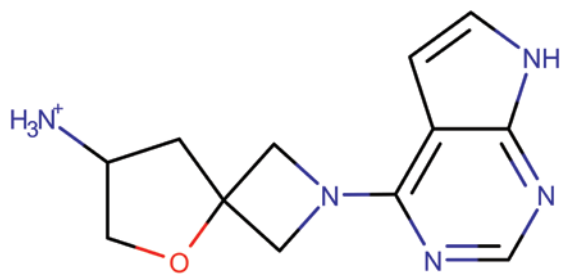
ja gátolni az ATP kötődését, és ezáltal az enzimaktivitást.

Fehérjeszerkezet-alapú, vagy ligandumalapú?

Mi a fehérjeszerkezet-alapú ligandumdokkolással foglalkoztunk, vagyis a fehérje kötősebe alapján próbáltunk meg gátlószert találni, de van lehetőség ligandumalapú keresésre is. A különböző vegyületek tulajdonságait számítógéppel, egyedi „molekuláris ujjlenyomatok” segítségével tudjuk kódolni, és ezáltal könnyebbé válik a hasonlóság keresése az egyes molekulák között. Így, ha már ismert egy jól kötődő ligandum, akkor lehetőség van hasonló vegyületek keresésére, melyek valószínűsíthetően szintén jól kötődnek a fehérjéhez. Ez a ligandumalapú keresés.



1. ábra A ligandumok építéséhez általunk használt alapvázak. A különböző spirovegyületeket az „R-csoport” mentén csatoltuk a vázákhoz.



2. ábra Egy ligandumjelölt a háromdimenziós átalakítás előtt. Általunk a 2-es sorszámot kaptuk.

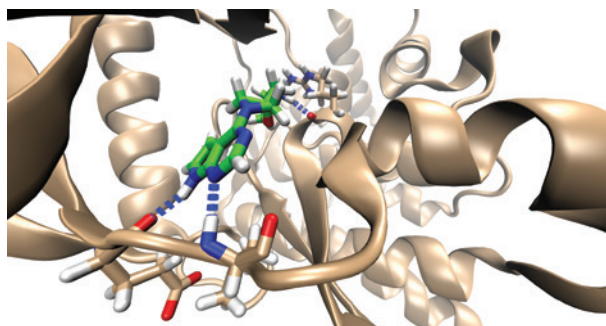
Alapváz és spirovegyület

A vizsgált inhibitorokat két építőelemből állítottuk össze virtuálisan:

I) kétféle alapváz valamelyikéből, illetve

II) számos nitrogént, illetve bizonyos esetekben egyéb heteroatomot tartalmazó spirovegyületből. Spirovegyületről beszélünk, amikor egyetlen atom (jellemzően szénatom) kapcsol össze két gyűrűt a vegyületben. Az alapvázak olyan vegyületek voltak, amelyekről a szakirodalomból tájékozódva ismertes, hogy jól kötődnek az általunk kutatott JAK fehérjék vizsgált kötőzsebébe.

Az egyes ligandumokat a két építőelemből a MarvinSketch nevű programmal (<https://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch>) készítettük el. Az ún. Markush Enumeration parancs segítségével gyorsan össze tudtuk illeszteni az alapvázakat a spirovegyületekkel. A két alapváz (1. ábra) meghatározott két atomjához egy-egy „R-csoportot” (R-group) illesztettünk, a spirovegyületek láncban megtalálható nitrogénatomjaihoz pedig egy „R-csoport mellékletet” (R-group attachment) csatoltunk. A Markush Enumeration összekötötte az R-csoportokat az R-csoport mellékletekkel, így



3. ábra A Janus-kináz enzimhez (világosbarna szalag) kötődő 2-es sorszámú ligandum (zöld pálcika). A modell alapján a molekula jól kötődik a kötőzsebbe; kék színnel a várható hidrogénkötések láthatóak.

előállítva az alapvázak és a spirovegyületek számának szorzatával megegyező számú molekulát.

2D-ből 3D, a sokból még több

A generált szerkezetek kétdimenziósak voltak (2. ábra), a valóságban azonban egy molekula általában háromdimenziós szerkezetű, és több konformációban (térbeli elrendeződésben) is előfordulhat, így a vegyületeket háromdimenziós formába is átalakítottuk. Miután a MarvinSketch elkészítette a 84 ligandumjelöltet, az egyes molekulákat a Maestro nevű programba exportáltuk (<http://schrodinger.com>), amely a ligandumdokkoláshoz használható számos funkciót tartalmaz, többek között képes meghatározni az egyes molekulák legvalószínűbb konformációit. Ennek megfelelően a gyógyszermolekula keresésének további szakaszában 84-nél több molekulával foglalkoztunk.

Sok ezer atom pontos helye

A vegyületek különböző konformációinak megtalálása után következett a fehérjemolekulák (JAK1, JAK2) előkészítése. Egy, az interneten található fehérje adatbázisból, a Protein Data Bank-ből (PDB) importáltuk a proteinek szerkezetét. A Maestro képes a PDB-azonosítók értelmezésére, és azok megadásával gyorsan betölthetőek az óriásmolekulák háromdimenziós formában. A JAK1 (PDB-azonosító: 3EYG), illetve a JAK2 (PDB-azonosító: 3FUP) általunk használt szerkezeteit röntgen-diffrakciós módszer segítségével határozták meg, ezért szükség volt a hidrogénatomok helyzetének pontosítására. Ez azért fontos, mert a dokkoláskor lényeges szempont a másodrendű kölcsönhatások – különösen a hidrogénkötés – jelenléte, helyzete és kötéshossza.

A dokkolás

A két fehérje, illetve a ligandumok előkészítését követte a dokkolás folyamata, amely a ligandumok fehérjébe történő beillesztését, és a lehetséges kötőkonformációk azonosítását jelenti. A Maestro nevű program a megfelelő paraméterek beállítását követően – melyet a Grid Generation parancs segítségével valósítottunk meg – elkészítette a dokkoláshoz szükséges fájlokat. Nagy adatbázis esetén ezután lehetőség van nagy teljesítményű számítógépek igénybevételére, mert maga a dokkolás esetenként órákig, akár napokig is eltarthat. A program a Ligand Docking funkcióval indítja el a dokkolást, melynek során a Maestro számos szempontot figyelembe véve minden kötőkonformációhoz hozzárendel egy pontszámot, amely alapján egy



4. ábra Munka közben - a VMD, illetve a Maestro kezelőfelületével.

sorrendet állít fel a ligandumok között a fehérjéhez való kötődési hajlamuk alapján.

Véletlen sorrend, vagy tudatos illesztés?

Vizsgáltuk, hogy a számítógép mennyire „tudatosan” választotta azokat a vegyületeket, amelyeket a lista elejére sorolt. Retrospektív validálást (vizszatekintő érvényesítést) végeztünk: egy adatbázis-kezelő program, a KNIME (<https://knime.org>) segítségével már ismert (kísérletileg megerősített) JAK1, és JAK2 inhibitorokat kevertünk feltételezhetően inaktív, úgynevezett csalimolekulákhoz. Az aktív inhibitorokat a ChEMBL adatbázisából, illetve Röntgen-szerkezetekből importáltuk. A csalimolekulákat pedig a DUD adatbázis (<http://dud.docking.org>) CDK2 kináz készletéből töltöttük be.

Adatbáziskezelés

A KNIME képes adatokat olvasni, szűrni, szétválasztani, kiírni a megadott utasításoknak megfelelően. A program kezelőfelületével egyfajta folyamatábra készíthető, amelynek alapegységei a csomópontok (node-ok), melyek egymással összeköttetésben állnak. Számos fajtája létezik ezeknek az egységeknek; mindegyik egyfajta feladatot lát el. Először az összes ligandumot beolvastattuk a programmal egy olvasó node segítségével. Ezt követően egy szűrést (a diverz szelekciót) végeztünk el: a program az utasításnak megfelelően kiválasztott az aktív ligandumokból 80 darabot úgy, hogy az egyes ligandumok a lehető legnagyobb mértékben különbözzenek egymástól. Összekötöttük az olvasó node-ot a diverz szelekciót végző csomóponttal, így utóbbi azokból az adatokból dolgozott, melyeket előbbi beolvasott. A 80 diverz molekula kiválasztására a ligandumalapú dokkoláshoz is használható molekuláris ujjlenyomatok alapján nyílik lehetőség. Ezt követően egyesítettük a csalimolekula-adatbá-



5. ábra A VMD illusztráló program.

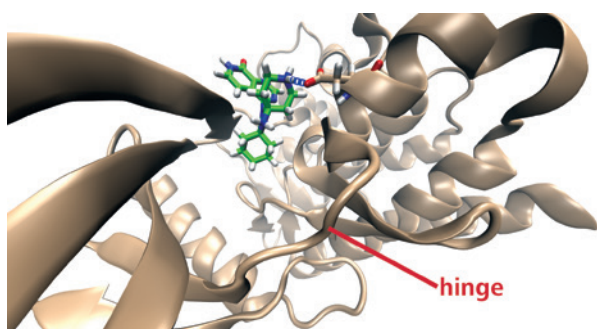
zist az előbb kiválasztott 80 aktív molekula adatbázisával, és egy író node-dal kiírtuk az összesített listát. Így egy újabb ligandumlistát kaptunk, amit dokkolhattunk a JAK1, illetve JAK2 fehérjék megfelelő kötőzsebeibe.

Eredmények, értékelés

ROC-görbe segítségével ábrázoltuk a retrospektív validálás eredményét. Megkülönböztettük a csalimolekulákat az aktív molekuláktól, és egy grafikont készítettünk. A vízszintes tengely a csalimolekulák arányát (false positive rate – FPR), míg a függőleges tengely az aktív molekulák arányát (true positive rate – TPR) mutatja. Az ábrán található egy a vízszintessel 45 fokot bezáró egyenes, az jelöli azokat a pontokat, amelyeknél teljesül, hogy az aktív és az inaktív molekulák aránya megegyezik: ezt az egyenest akkor kapnánk, ha a számítógép véletlenszerűen sorolta volna be az aktív és inaktív molekulákat. Az egyenes feletti terület aztokat a pontokat jelöli, ahol igaz az, hogy az aktív vegyületek aránya nagyobb, mint az inaktívaké, az egyenes alatti terület pedig azokat, ahol igaz, hogy az inaktív vegyületek aránya haladja meg az aktívakét. A dokkolás



6. ábra A Maestro nevű program egy fehérjével.



7. ábra Az 52-es sorszámú ligandum (zöld pálcika) kötődése a JAK2-fehérjéhez. A képen megfigyelhető, hogy a vegyület viszonylag nagy a kötőzseb méretéhez képest, és nem is illeszkedik bele megfelelően; a jelölt hinge-régióhoz pedig nem is kapcsolódik, ami kulcsfontosságú lenne. Így azt a következtetést lehet levonni, hogy ez a molekula rosszul fog kötődni a proteinhez.

hitelességének bizonyításához az szükséges, hogy az aktív vegyületek legyenek nagyobb arányban, ezért minél nagyobb a görbe alatti terület, annál jobb a módszerünk az aktív molekulák kiválogatásában. A ROC-görbe eleinte meredek emelkedése azt is megmutatja, hogy nagy a korai dúsulás. Ez azt jelenti, hogy a lista elején nagy mennyiségben vannak jelen a bizonyított aktív molekulák.

Mindenhez kötődő ligandum

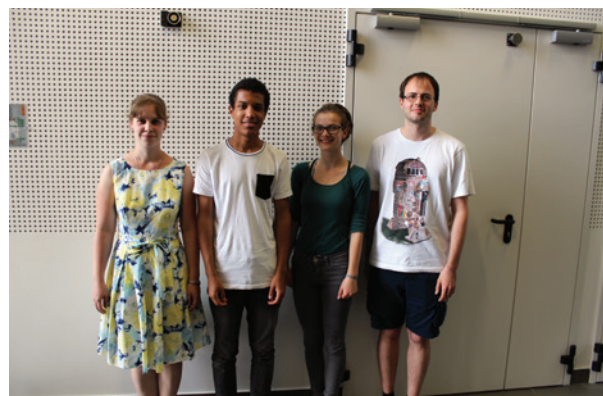
A gyógyszertervezés során törekedni kell a molekula szelektivitására is. Ha egy ligandum sok fehérjéhez kötődik, az gyógyszerként mellékhatásokat idézhet elő. Találtunk olyan ligandumot, amely nagyon jól kötődik mindkét fehérjéhez, de lehetséges, hogy csak az egyikük gátlására van szükség, így az a vegyület nem feltétlenül lenne megfelelő gyógyszer. Az IC_{50} érték meghatározásával megkapjuk, hogy mi az a ligandumkoncentráció, amely a fehérje aktivitását a felére csökkenti. Ez jó összehasonlítási alapot ad a szelektivitás vizsgálata során.

Illusztrálás

Végül a könnyű szemléltetéshez ábrákat készítettünk a már dokkolt ligandumokról a fehérjék kötőzsebeiben (3. és 7. ábra). Jól látszott az, hogy a lista elején található, feltételezhetően jól kötődő molekuláknál megjelennek a másodrendű kölcsönhatások a fehérjéket alkotó aminosavakkal, illetve ezek a vegyületek megfelelően kitöltik a kötőzsebet, nem lógnak ki belőle, szemben a lista végén található vegyületekkel. A VMD program (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>) segítségével készített képek által jól láthatóvá vált a kötőzseb, illetve a molekulák alakjának szerepe is.

Befejezés

Kutatási hetünk lezárásaképp kutatótársammal, Kopacz Zsófiával közösen előadtuk mindazt, amit az egy hét alatt megtanultunk, és így talán többen kerülhettek közelebb egy kicsit a gyógyszerkutatás rejtelméhez. Köszönettel tartozunk témavezetőinknek: Bajusz Dávidnak és Kiss Dóra Juditnak a magyarázatokért, illetve a programok megismertetéséért. Kutatásunk nem jöhetett volna létre a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpontjának támogatása, illetve a szervezők, különösen Lendvayné Győrik Gabriella munkája nélkül.



8. ábra Témavezetőinkkel.

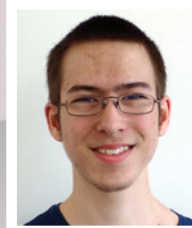
Liposzómás gyógyszerhordozók előállítása

Arany Eszter

Lovassy László Gimnázium, Veszprém

Kovács Márton

Eötvös József Gimnázium, Budapest



émavezetők:

Dr. Szigyártó Imola Csilla, Deák Róbert, Dr. Wacha András

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

Bevezetés

A kutatótáborban eltöltött hét alatt mi a liposzómák rejtelmeibe ástuk bele magunkat. Többek között megismerkedtünk különleges műszerekkel, mérési technikákkal, sőt, magunk is készítettünk liposzómákat.

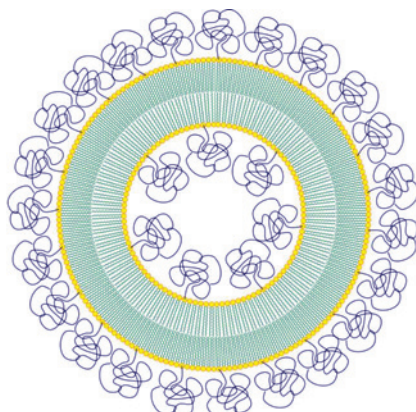
Mik is azok a liposzómák? A liposzómákat Alec D. Bangham (1921-2010) brit hematológus fedezte fel, a Cambridge-i Babraham Institute új elektronmikroszkópjának tesztelése során. A liposzómák tulajdonképpen mesterségesen létrehozott sejtmembránnak felelnek meg. A természetes membránokhoz hasonlóan foszfolipid kettősrétegből állnak, különbségek tulajdonképpen a membrán fehérjékben, valamint a sejtmembránhoz kapcsolódó szénhidrátokban vannak. Mivel az őket alkotó foszfolipid molekulák amfipatikus tulajdonságúak, így hidratált állapotban polaritásuk szerint rendeződnek (kettősréteget alkotnak), ilyen formában pedig képesek különböző poláris és apoláris anyagok befogadására, szállítá-

sára. Rétegezettségük szerint megkülönböztetünk unilammellás (egy kettősréteget tartalmazó membránszerkezetű) és multilammellás (több kettősréteget tartalmazó membránszerkezetű) liposzómákat.

Felhasználásuk jelentős a kozmetikai iparban (krémekben segítik a hatóanyag felszívódását, és, mivel a szervezet nem tartja testidegennek a liposzómákat, így csökken az allergiás reakció valószínűsége), továbbá az élelmiszeriparban és nem utolsósorban a gyógyszeriparban. Gyógyszerhordozókként átmenetileg elrejtik a gyógyszert az immunrendszer elől, sőt, a vezikulumok akár nukleinsavakat is képesek magukba zárni, melyek így a sejtmagba is eljuthatnak.

Előnyük a szabad gyógyszermolekulák beadásával szemben, hogy a nanohordozók célzottan szállítják a hatóanyagot, így csökkenthetők a mellékhatások. Ebből adódóan kisebb mennyiség is elegendő a gyógyszerből, és a liposzómák belsejében az érzékeny molekulák is megóvhatók a célba jutásig.

Célunk a kutatótáborban a doxorubicin nevű rákgyógyszer liposzómába töltése, majd az így nyert rendszer vizsgálata volt.



1. ábra Az általunk is használt unilammellás liposzómák sematikus rajza

Felhasznált anyagok

A recept a következő összetevőket tartalmazza:

1. Lipidek

- HSPC (hidrogénezett szójalecitin)
- DSPE-PEG (disztearil-sn-glicerofoszfát idil-etanolamin-polietilén-glikol)
- Koleszterin

2. Pufferek

- Hisztidin-szacharóz, pH: 6.5
- Ammónium szulfát

3. Doxorubicin (a betöltendő anyag)

Mintakészítés

Előkészületek

A munkafolyamat első lépése a lipidek bemérése volt. HSPC (hidrogénezett szójalecitin), koleszterin, majd DSPE-PEG2000 (disztearil-sn-glycero-foszfátidil-etanolamin-polietilén-glikol 2000) voltak a felhasznált anyagok, melyeket analitikai mérlegen mértünk. A száraz lipid keveréket ezután metanol-kloroform (1:2) elegyében feloldottuk, hogy az egyes komponensek megfelelően elkeveredjenek. Az oldatot ezután rotációs vákuumbepárlón bepárloltuk, majd szárítószekrénybe tettük. Különösen érdekes volt, hogy milyen rövid idő elegendő nagy vákuum eléréséhez. A többszöri vákuumbepárlás célja a maradék szerves oldószer nyomok eltávolítása volt, hiszen ezeknek a jelenléte hidratálás után is oldatban tartaná a lipideket, ezzel megakadályozná a megfelelő liposzóma képződést.

Ezután a betöltéshez szükséges puffereket is elkészítettük: 6,5 pH-jú hisztidin-szacharóz oldatot és ammónium-szulfát oldatot.

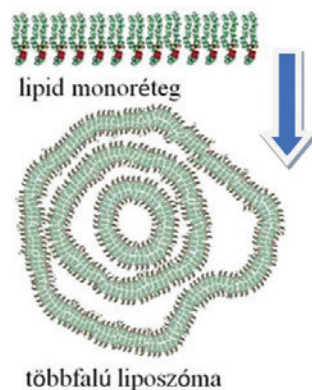
Liposzómák készítése

A következő lépésben a lipidjeinket rá kellett bírni, hogy gömb alakot vegyenek fel az addigi réteges elrendeződés helyett liposzómákat alkotva. Ezt úgy értük el, hogy a lipidfilm réteget hidratáltuk (egyszerűen felöntöttük az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -pufferrel).

Ezután fagyálló csőbe helyezve, többszöri hőtornának vetettük alá. A hőtorna lényegében fagyasztásból és felolvasztásból állt, melynek célja a liposzómák felnyitása és összezárása volt, így megfelelően homogén oldatot kaptunk.

Extrudálás

A hőtornáztatás során multilamellás liposzómákat kaptunk, melyeket úgy kell elképzelni, mint egy hagyma rétegeit. Ezeket aztán 100 nm-es pórusokkal



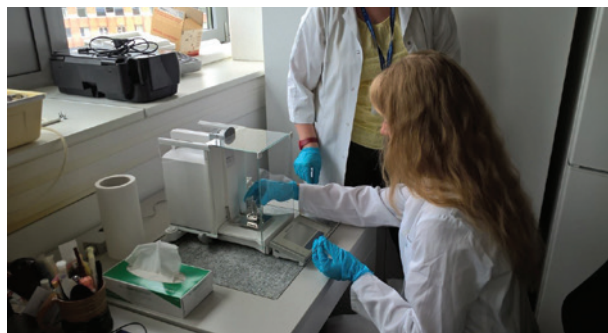
3. ábra lipidekből liposzóma (forrás:http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0025_vegy_7/ch05s04.html)

rendelkező membránon nagy nyomáson extrudáltak, így kisebb, unilamellás (egyrétegű) liposzómákat nyertünk. Az extrudálás a vezikulumok polikarbonát mikroszűrőn való áltpréselését jelenti, amely így megfelelő méretűvé alakítja át a liposzómákat.

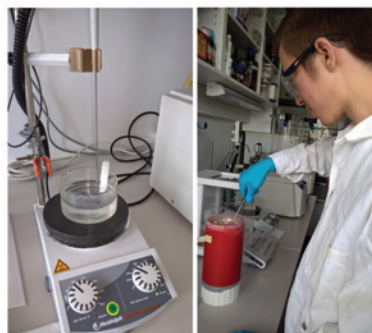
A kész (ammónium szulfátos) liposzóma oldatot átcsöpögtettük egy Sephadex G-25M töltetű oszlopon, amelyet előzőleg hisztidin-szacharóz oldattal mostunk át. Megvártuk, amíg a liposzóma oldat teljesen bejut a gélbe, majd megfelelő mennyiségű hisztidin-szacharóz puffer rátöltésével lemostuk a vezikulumokat az oszlopról. Ezáltal lecseréltük a puffert a liposzómák körül. Kívül a hisztidin-szacharóz lett a puffer, a liposzómákon belül pedig maradt az ammónium szulfátos puffer.

Doxorubicin hatóanyag betöltése

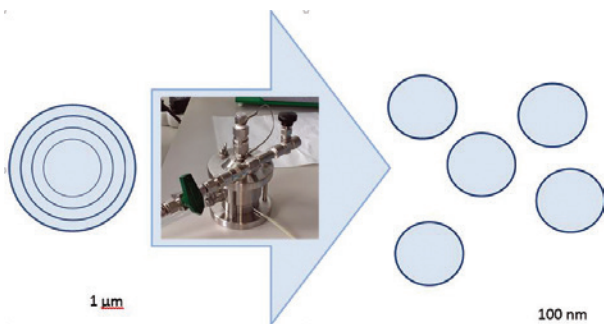
A hordozók elkészítése után a betöltés következett. 60°C-os vízfürdőbe és mágneses keverőlapra helyeztük a liposzómáinkat tartalmazó oldatot, majd hozzáadtuk a doxorubicin vizes oldatát. A reakcióelegyből mintákat vettünk, hogy később mérésekkel követni



2. ábra Száraz lipidek összemérése analitikai mérlegen



4. ábra Multilamellás liposzómák kialakítása hőtornával



5. ábra Unilamellás liposzómák előállítása multilamellásakból extrudálással, középen az extrúder, bal oldalon a hagymaszerű, multilamellás, jobb oldalon az elkülönült unilamellás liposzómák membránjai

tudjuk a betöltődött hatóanyag mennyiségét 0, 2, 5, 7, 10, 20 és 60 perc elteltével. A doxorubicin az ammónium szulfát hatására csapadékként felgyűlik a liposzómák belsejében. Ahhoz viszont, hogy méréseket végezhessünk az anyaggal, szét kellett választanunk a doxorubicinnel töltött liposzómákat a szabad doxorubicintól. Ezt Zeba Spin mini oszlopokkal, kromatográfiásan tettük meg centrifuga segítségével.

Mérések

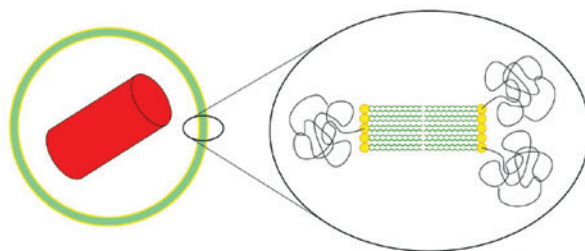
Kisszögű röntgenszórás

Első mérésünk az úgynevezett kisszögű röntgenszórás vizsgálata volt. Először a mintákat mérhető állapotba hoztuk: 1 mm-es külső átmérőjű kapillárisokba töltöttük, melyeket utána le is ragasztottunk, hiszen a műszer vákuumban mér, és a vákuum kiszippantotta volna a kapillárisokból a mintát. A ragasztónak a lehető legkisebb mértékben szabad párolognia, hogy ne tegye tönkre a mintát. Ezután a műszer kalibrálása következett, melyet az x tengelyen SBA 15-tel (egyfajta mezopórusos szilika por) és ezüst-behenáttal végeztünk, mert ezeknek az anyagoknak erős és jellegzetes csúcsokat mutató szórási képük van. Az y tengely kalibrációjához üveges szemet használtunk. A berendezésen kívüli eredetű háttér nagyságát úgy mértük, hogy a röntgennyalábot az alumínium mintatartó tömbbel kitakartuk. A berendezés optikai elemeiről származó háttérjelet – a parazita szórás – „üres nyaláb méréssel” határoztuk meg. A minta hőmérsékletét termosztát szabályozta. Fontos szerepe volt a primer nyalábfogónak, amely kitakarja a nem szóródott sugárzást, hiszen ez károsítaná az igen érzékeny detektort. Mindazonáltal a mintákat a primer nyalábfogó elmozgatásával, a – gyengített – direkt nyaláb mérésével kereste meg a műszer. Ehhez két mérést végzett: a mintamozgató motort először durvább, majd finomabb lépésköz-

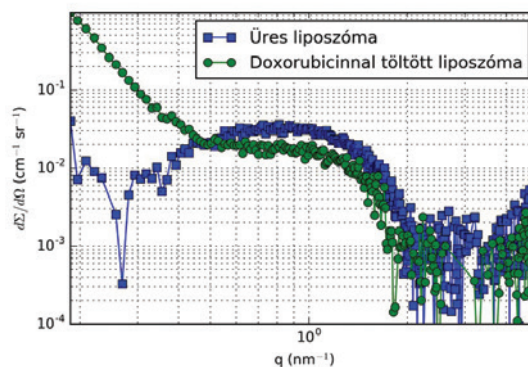
zel léptetve. A számítógéppel kirajzoltattuk a mért sugárintenzitást a motorpozíció függvényében. Ezt a függvényt a számítógép deriválta, és az így nyert görbén a pozitív és negatív csúcsok illesztésével meghatároztuk a kapilláris két szélének pontos helyét, melyből a közepe, ill. az átmérője számítható volt. Ezután a transzmissziómérés következett, azaz meghatároztuk, hogy a beeső nyaláb hányadrészét engedi át a minta. Miután a műszert így beállítottuk, következett a tényleges mérés. A jó mérési statisztika eléréséért mintánként átlagosan 2,5 óráig mértünk automatikus üzemmódban. A szórási képeken a szükséges korrekciókat (például a háttérsugárzás és parazita szórás levonása) és kalibrációkat a mérőprogram automatikusan elvégezte. A kapott grafikonon jól látható a kettős foszfolipidréteg jele (széles „hupli” 1 nm^{-1} környékén), és a különbség a betöltött és betöltetlen minták között. A betöltött mintánál megmarad a „hupli”, de $0,5 \text{ nm}^{-1}$ alatt megjelenik a doxorubicin jele, mely a „hupli” bal oldalát kitölti.

Dinamikus fényszórás

Dinamikus fényszórás mérésével megállapíthatjuk a mintában levő részecskék átlagos méretét és méreteloszlását. Ennek módja, hogy a küvetába töltött mintánkat a készülék egy lézernyalábbal megvilágítja. Egy detektor érzékeli a szórt fény mértékét, ami összefüggésben van a minta részecskéinek átlagos méretével. A mérőprogram segítségével megállapíthatjuk, hogy a liposzómaink megfelelő mérettel és szűk méreteloszlással rendelkeznek.



6. ábra A doxorubicin elhelyezkedése a liposzómában



7. ábra Liposzómák kisszögű szórási görbéi

Infravörös spektroszkópia

Az infravörös spektroszkópia alapja, hogy az adott anyagra/ligandumra jellemző, hogy az infravörös sugárzásnak mely szegmenseit nyeli el (abszorbeálja). Ennek segítségével megállapíthattuk, hogy a kész, betöltött liposzómákban magas a CH_2 , $\text{C}=\text{O}$ ligandumok száma, illetve megtaláltuk a doxorubicin jeleit is, amik a betöltetlen mintánál természetesen hiányoztak.

UV-látható spektroszkópia

A doxorubicin bezárási hatásfokának megállapításához kalibráló sort készítettünk: azaz ismert doxorubicin tartalmú oldatok UV-látható spektrumát felvettük, és 480 nm-en leolvastuk az abszorbancia értékeket.

Ezután ugyancsak 480 nm-en megmértük a betöltésnél a megfelelő időközönként kivett minták abszorbanciáját (9. ábra).

Az UV látható spektroszkópiából azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a doxorubicin hatóanyag betöltődése az első öt percben történik meg, utána

gyakorlatilag nincs változás. A teljes mennyiségnek a 80%-át sikerült betölteni.

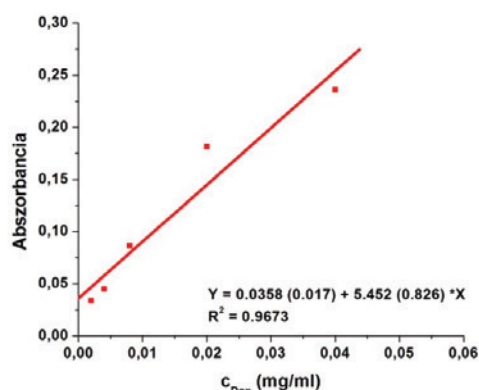
Összefoglalás

Célunk volt tehát a liposzómák hatóanyaggal való megtöltése, majd összehasonlítása a gyári készítménnyel. Ehhez kisszögű röntgenszórást, dinamikus fényszórást, infravörös- és UV-látható spektroszkópiai vizsgálatokat végeztünk. Vizsgálatainkból azt a következtetést vonhattuk le, hogy az általunk készített liposzómák valamivel nagyobbak lettek a gyári készítménynél, és nagyobb lett a polidiszperzitás (méretingadozás) mértéke is. Megállapítottuk továbbá, hogy megközelítőleg 80%-os hatásfokkal tudtuk betölteni a hatóanyagot, ami az első öt percben történt meg, utána már nem észleltünk számottevő változást.

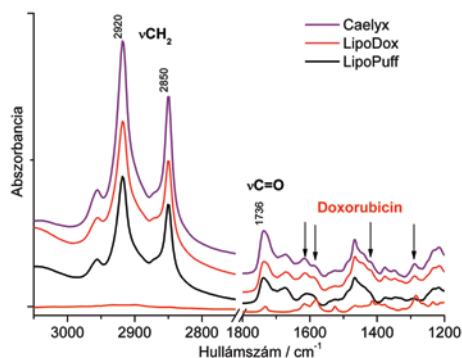
Összességében az egy hét munka alatt rengeteget tanultunk témavezetőinktől, akiknek ezért köszönjük fejezzük ki. Jártasságot szereztünk laboratóriumi munkában, saját bőrünkön tapasztalhattuk meg, milyen kutatóként dolgozni, sőt, még a kézzsibbasztót (hivatalos nevén vortex-keverőt) is felfedeztük...

Dinamikus fényszórás			
Minta	Átlagos átmérő	Szórás	Polidiszperzitás
Liposzóma pufferben	185 nm	± 29 nm	16%
Liposzóma Doxorubicin oldatban	165 nm	± 64 nm	38%
Caelyx (gyári készítmény)	101 nm	± 18 nm	18%

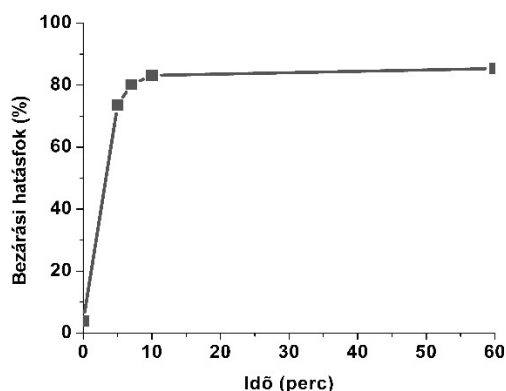
1. Táblázat Liposzómás minták dinamikus fényszórással meghatározott átlagos mérete és méreteloszlása.



9. ábra Doxorubicin oldat UV-látható spektroszkópiával nyert kalibrációs görbéje



8. ábra eredeti (Caelyx) és saját készítésű liposzómába zárt doxorubicin (LipoDox), valamint az üres liposzóma (LipoPuff) infravörös spektruma



10. ábra UV-látható spektroszkópiával meghatározott bezárási hatásfok az idő függvényében

Egy új szerves molekula előállítása és jellemzése

Orosz Máté

Békéscsabai Andrassy Gyula Gimnázium és Kollégium

Szabó Renáta

Kecskeméti Katona József Gimnázium



émavezetők:

Dr. Ábrányi-Balogh Péter, Sóvári Dénes

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet

Bevezetés

A kutatótáborban megannyi közösségi és egyéb élmény mellett szakmai tudással is gazdagodtunk. Munkánk során megismerhettük közelebből az intézmény szerves kémiai laboratóriumait, és együtt dolgozhattunk kutatókkal.

Feladatunk egy új szerves molekula előállítása és jellemzése volt. Mindezen felül azt szerettük volna a táborban eltöltött 5 munkanap alatt megtudni, hogy az általunk előállított izokinolin-származékok lehetnek-e gyógyszerhatóanyagok.

Az izokinolin-származékok jótékony hatásai

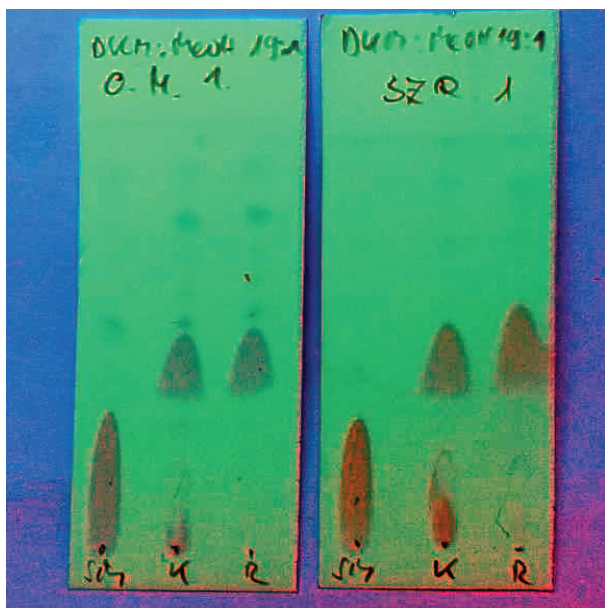
Számos gyógyászati felhasználású izokinolin-szár-

mazék ismert mint értágító és vérnyomáscsökkentő hatású szer, valamint fertőtlenítő, gomba- és rovarölő hatásuk miatt is alkalmazzák ezeket a vegyületeket. A festék- és textiliparban is elterjedtek mint színezőanyagok. A természetben megtalálható izokinolin alapú alkaloidok családjába több mint 400 származékot sorolunk. Biológia aktivitásuk antimaláriás, antibakteriális hatásukban is megmutatkozik. Néhány ismertebb származék: a (S)-szal-szolinol (kakaó), mely antidepresszáns, a papaverin (mák), mely simaizom görcsoldó hatású. Ugyancsak simaizom görcsoldó hatású a drotaverin, mely az ismert No-Spa tablettá hatóanyaga. Ez az izokinolin származék görcsoldó hatását a foszfodiészteráz enzim gátlása révén fejti ki. Célkitűzésünk az volt, hogy a fentiekhez hasonló következő vegyületeket állítsuk elő: a (Z)-1-(6-metoxi-3,4-dihidroizokinolin-1(2H)-ilidén)propán-2-ont (Reni) és a (Z)-1-(6,7-dimetoxi-3,4-dihidroizokinolin-1(2H)-ilidén)propán-2-ont (Máté).

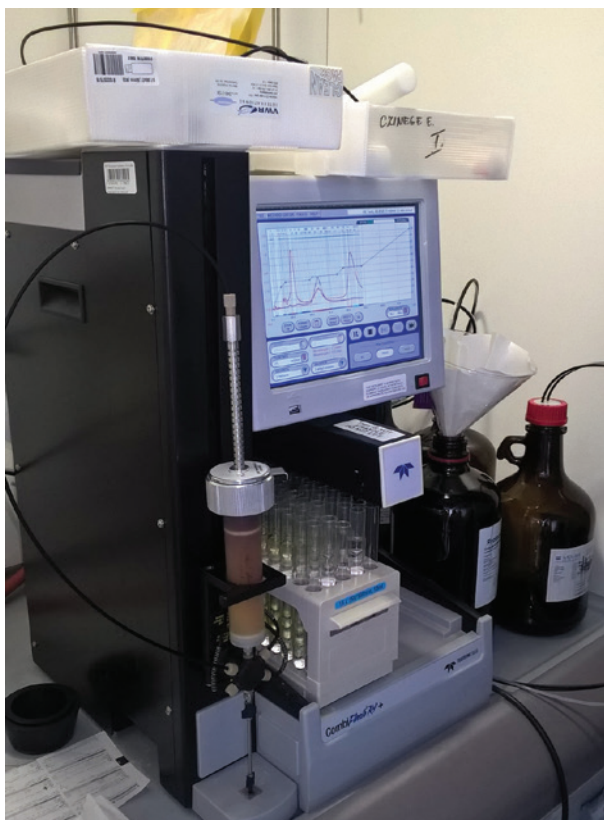
Hogyan jutottunk el a végtermékig?

Az első munkanapon a laborban a témavezetőinktől megkaptuk a kiindulási anyagainkat, melyek nitrogéntartalmú oldallánccal rendelkező aromás vegyületek voltak. Ez Reni esetében a 2-(3-metoxifenil)etil-amin, míg Máté esetében a 2-(3,4-dimetoxifenil)etil-amin volt. A két molekula szerkezetében csupán annyi a különbség, hogy a Máté által kapott molekulában eggyel több metoxicsoport található, ami a szintézis bizonyos lépéseiben hatással volt a reakció termelésére.

A kívánt végtermékig többlépéses szintézis elvégzése során jutottunk el. Az első lépésben acile-

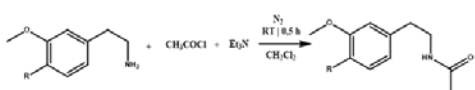


1. ábra Vékonyréteg-kromatográfiás ellenőrzés



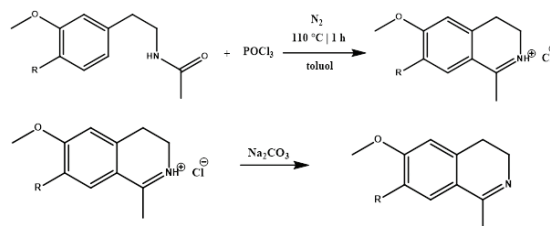
2. ábra Flash kromatográf berendezés

zést hajtottunk végre. Először a kapott mintákat háromnyakú gömblombikba helyeztük, majd feloldottuk őket diklórmétánban, mely a szintézis során többször is oldószerként funkcionált, majd ezekhez trietil-amint (továbbiakban TEA) adagoltunk. Acilezőszerként acetil-kloridot használtunk. Természetesen ügyelni kellett arra, hogy a közeg, melyben a reakció végbemegy, ne legyen vizes, mert a közegbe kerülő vízpára reakcióba léphetne a reagensként használt acetil-kloriddal, ezért inert nitrogén gáz atmoszférát használtuk. A TEA trietil-ammónium-klorid formájában megkötötte a fejlődött HCl-gázt, az amidtípusú vegyületeink pedig nagyjából fél óra elteltével kialakultak. A reakcióelegyet először vízzel, majd sósavval, ezt követően 5%-os Na_2CO_3 oldattal, végül pedig ismét vízzel extraháltuk. A szintézis első lépésének befejezéseként MgSO_4 -tal szárítottuk, majd bepárlással kinyertük. Reni esetében az N-[2-(3-metoxifenil)etil]acetamidot, Máté esetében pedig az N-[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]acetamidot. A reakció végbemenetelét vékonyréteg-kromatográfiával ellenőriztük, majd kiszámoltuk az első lépés termelési százalékait, melyek kiválóan adódtak (rendre 95% és 88%).



Az egyenletben itt és a továbbiakban is $\text{R} = -\text{H}$, ill. $\text{R} = -\text{OCH}_3$.

A szintézis második lépésében gyűrűzárást kellett elvégeznünk. Ezt a speciális gyűrűzáró folyamatot Bischler-Napieralski reakciónak nevezzük. A folyamat előtt az első lépés termékeit feloldottuk toluolban, és nitrogén atmoszférába helyeztük. Ezt követően lassan, az oldatot folyamatosan kevertetve hozzáadtuk a foszforoxiklorid reagenst, melynek hatására lejátszódott a Bischler-Napieralski reakció. Ezek után 1 órán át forraltuk a rendszert, melynek eredményeképpen bepárlás után egy hidroklorid-sót kaptunk. Ezt a sót dietil-éterben eldörzsöltük és leszűrtük, majd diklórmétánban feloldottuk, és kevertetés közben telített Na_2CO_3 -oldatot adtunk az elegyhez, hogy a sót elbontsuk. Extrahálást, szárítást és bepárlást követően kinyertük a második lépés termékeit: Reni esetében a 6-metoxi-1-metil-3,4-dihidroizokinolint, míg Máténál a 6,7-dimetoxi-1-metil-3,4-dihidroizokinolint. Ellenőriztük a reakció végbemenetelét, majd megállapítottuk, hogy ismét kiváló hatásfokkal dolgoztunk (rendre 92% és 85%).



A harmadik lépésben egy újabb acilezést vittünk véghez, az előző termékek feloldását követően az első lépcsőhöz hasonlóan acilezőszerként acetil-kloridot használtunk, és trietil-aminnal kötöttük meg a fejlődő HCl-ot. A nyerterméket flash kromatográfiával tisztítottuk, mely berendezés érzékeltette többek között az acilezett termékeink UV-abszoranciáját (fényelnyelését), és az alapján választotta el őket a szennyezőktől. A flash kromatográfia el-



3. ábra Az utolsó lépésben „felfűtjük” a bombacsöveket



4. ábra LC-MS műszer

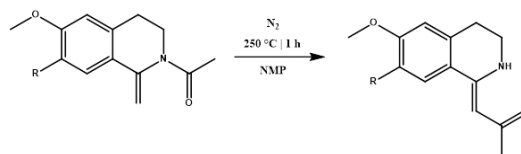
végzésekor érdekes jelenséget figyelhettünk meg: a folyamat után NMR-spektroszkópiával vizsgáltuk a termékek anyagi minőségét, és a vizsgálat kimutatta, hogy Reni esetében a molekula B gyűrűje felnyílt. A gyűrű felnyílását a flash kromatográfiánál használt oszlop töltőanyaga, a szilikagél (SiO_2) okozta, amely savas karakterű. Máté esetében ilyen jelenséget nem tapasztaltunk, mivel nála töltőanyagként Al_2O_3 -t használtunk, mely bázikus karakterű. A harmadik lépés reakcióegyenlete, és a gyűrűfelnyílás jelensége:



Ezután már csak a célvegyület előállítása volt hátra, ami Reni esetében az 1-(6-metoxi-1-metilidén-3,4-dihidroizokinolin(1H)-il)etán-1-on, míg Máté esetében az 1-(6,7-dimetoxi-1-metilidén-3,4-dihidroizokinolin(1H)-il)etán-1-on volt. Ezen utolsó lépésben egy izomerizációt hajtottunk végre, melyben a molekulán belül áthelyeztünk egy acetilcsoportot. A reakciót 250°C -on, olajfürdőben, nitrogén atmoszférában végeztük, és N-metilpirrolidinont használtunk oldószerként, mely segítette az acetilcsoport „vándorlását”. A flash kromatográfiás tisztítás után megállapítottuk, hogy a termelési százalékok ebben az esetben sajnos csak közepesek voltak.

Szerkezetmeghatározásként ^1H NMR spektrumot vettünk fel, és sikeresen beazonosítottuk a várt vegyületben lévő hidrogén atomokat. Ezen négy lépés-

ből álló reakciósor végén megkaptuk a kívánt célvegyületeinket. A negyedik lépés reakcióegyenlete:



Biológiai teszt az új szerves molekulákkal

Gyógyszermolekulák szintézisét követően nagyon fontos lépés az újonnan előállított vegyületek szerkezetének és hatékonyságának ellenőrzése. A biológiai vizsgálatot nagyhatékonyságú folyadékkromatográfhoz kapcsolt tömegspektrométer (LC-MS) segítségével végeztük. Az általunk előállított izokinolin származékok a szervezetben a kannabinoid receptor (CB1) cisztein aminosavaira fejthetik ki hatásukat. A receptor modellezéséhez glutationt használtunk, amely egy glicinből, ciszteinből és glutaminsavból álló tripeptid. A mérési eredmények alapján a monometoxi származék egyáltalán nem, míg a dimetoxi származék csak kismértékben kötődött a tesztmolekulánkhöz. 68 óra elteltével az anyag mindössze 15 %-a kötődött meg, melyből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy ezek a vegyületek még jelentős fejlesztésre szorulnak.

Konklúzió, köszönetnyilvánítás

A szerves laborokban töltött 5 munkanap alatt két új szerves molekulát állítottunk elő, melyekről végül kiderült, hogy kis cisztein-reaktivitásuk miatt gyógyszerhatóanyagoknak alkalmatlanok, de mivel „megszóltak” a biológiai teszteken, ezért érdemes lehet további fejlesztésükkel foglalkozni. Munkánkat nagy élvezettel és odaadással végeztük, és rengeteg új ismerettel gazdagodtunk. Hatalmas köszönettel tartozunk témavezetőinknek, akikhez bármikor fordulhattunk szakmai tanácsért, és nagyban segítették feladataink megoldását. Köszönet illeti továbbá Gabi nénit, aki nem kis munkával megszervezte a tábort, és lehetővé tette, hogy közel 1 hétig jó körülmények közt, jó társaságban és tudásunkat bővítve táborozhassunk.



5. ábra Köszönjük az itt töltött 5 napot!

Az illatok kémiája

Fülöp Anita-Petra

Tamási Áron Elméleti Líceum, Székelyudvarhely

Tóth Brigitta

Bethlen Gábor Református Gimnázium, Hódmezővásárhely

émavezetők:

Fegyverneki Dániel

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémiai Intézet

Dr. Ferenczi-Palkó Roberta

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet



Bevezetés

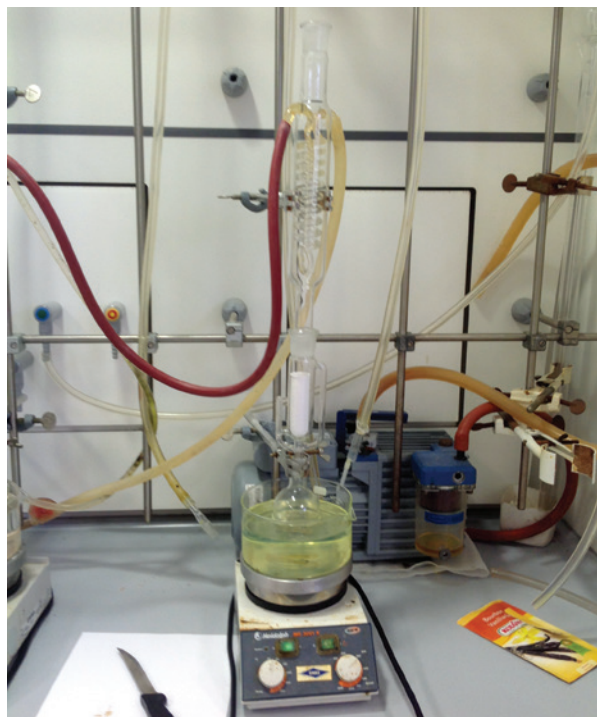
2016 nyarán volt szerencsénk részt venni a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont „AKI Kíváncsi Kémikus” nyári kutatótáborában. A táborba pályázattal lehetett bekerülni. A táborban 12 különböző, érdekesebbnél érdekesebb téma közül eggyel foglalkozhattunk. Mi az illatok világát tanulmányoztuk, így a hét során volt szerencsénk részletesebben megismerkedni a vaníliával, levendulával, korianderrel, kakukkfűvel és még sok más „csodanövény” kémiájával. És hogy miért is „csodanövények” ezek? A mindennapi életben betöltött szerepük és tágas felhasználási körük miatt. Lényeges tudni, milyen molekulákból épülnek fel az egyes jótékony hatású növények, hogy azokat a jövőben mesterségesen, ipari méretben is elő lehessen állítani.

Munkánk és táborozásunk célja

*„Ahhoz, hogy elérd a célod, tudnod kell, mit akarsz.”
(Gordon Ramsay)*

Ez az idézet nagyon jól illik ránk és a tábori ottlétünkre, ugyanis már az első napot azzal kezdtük a laborban, hogy témavezetőink tisztázták velünk, hogy tulajdonképpen mi is a célunk, milyen ismereteket fogunk az ott eltöltött egy hét során elsajátítani. A kutatótábori munkánknak két fő célja volt:

elsősorban az alapvető laboratóriumi műveletekkel való megismerkedés, másodsorban a hatóanyagok kinyerése bizonyos fűszerekből, növényekből, valamint azok mesterséges előállítása. A táborozásunk ideje alatt sikerült megismerkednünk olyan eljárásokkal, mint az extrakció, vékonyréteg- és oszlopkromatográfia, bepárlás olyan anyagokkal, mint



1. ábra Soxhlet-extraktor felépítése



2. ábra Futtatókád VRK-hoz

a levendula, vanília, kakukkfű, koriander és még sok-sok érdekességgel. De egy biztos! A kutatótábor ideje alatt nagyon sok tudással, tapasztalattal lettünk gazdagabbak, és kitűzött célok mellett még nagyon sok pluszt is kaptunk.

Alapvető laboratóriumi műveletek

1. Az extrakció

Extrakció során arra törekszünk, hogy két, egymással nem elegyedő fázis segítségével az egyik fázisban oldott anyagot a másik fázisba vigyük át, lehetőleg a többi jelenlevő anyag átvitele nélkül.

Folyadék-szilárd extrakció

A táborban leginkább az extrakciónak ezt a fajtáját használtuk, segítségével nyertük ki a különböző növények hatóanyagait. E folyamat jól bevált és hatékony eszköze a Soxhlet-extraktor (1. ábra), mely nevét feltalálójáról, Franz von Soxhletről kapta. A folyamat úgy történik, hogy a berendezés alján levő lombikban elhelyezett oldószer (esetünkben általában dietil-éter) forralás hatására folyamatosan párolog, majd a hűtőben lecsapódik, és a mintára

csepegve kioldja annak hatóanyagát. A körfolyamat több órán keresztül zajlik, ennek következtében az oldószer a mintából egyre több hatóanyagot mos ki, így az extrahálendő komponens feldúsul a lombikban.

Folyadék-folyadék extrakció

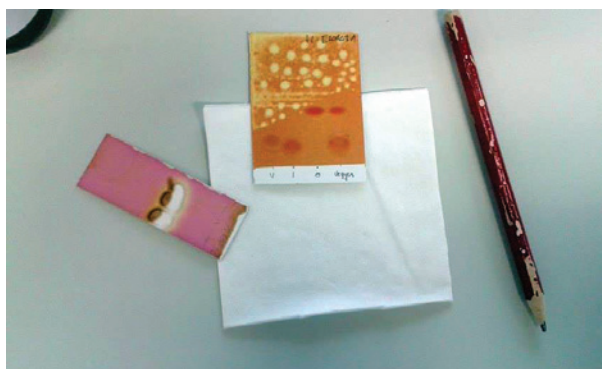
A folyadék-folyadék extrakció (a „kirázás”) során egymással nem elegyedő oldószerek segítségével érjük el, hogy a komponensek elváljanak egymástól. A „kirázás” egyszerűségének és gyors kivitelezhetőségének oka az, hogy a két folyadékfázis közti egyensúly a fázisok mozgékonyasága és nagy felületen való keveredése miatt gyorsan (kb. 1-2 perc alatt) beáll.

2. Kromatográfias módszerek

Kétféle kromatográfias eljárással foglalkoztunk: vékonyréteg-kromatográfiával (VRK) és oszlopkromatográfiával. Ezeket a módszereket anyagok kimutatására, elválasztására használtuk. Valamennyi kromatográfias eljárás ugyanazon az elven működik: szükséges egy állófázis és egy mozgófázis (eluens).

Vékonyréteg-kromatográfia

A VRK során alumíniumlemezre vékonyan felvitt szilícium-dioxidot használtunk állófázisnak, eluensnek pedig a kimutatni kívánt anyag(ok)nak megfelelő folyadékelegyet. Először a mintákat kapillárisal a megfelelő méretű vékonyréteglapra juttattuk. Ezután futtatókád (2. ábra) helyeztük, melybe már előre néhány mm vastagságban oldószerelegyet öntöttünk. Az eluenst néhány perc alatt „felfuttattuk”, mivel a kapilláris hatás felszívta az oldószert, mely a különböző kémiai szerkezetű



3. ábra Előhívott VRK lemez

anyagokat különböző magasságba vitte fel az adszorpciónak köszönhetően (3. ábra). UV-lámpa alatt is láthattuk az UV-fényben gerjesztődni képes vegyületek vándorlási távolságát, de elő is hívhattuk különböző előhívószerekkel (mi lúgos kálium-permanganát oldatot, vagy dinitro-fenilhidrazin oldatot használtunk a funkciós csoportnak megfelelően).

Oszlopkromatográfia

Az oszlopkromatográfia is hasonló elven alapul. A vizsgált minta mennyiségétől és anyagi minőségétől függően választottuk ki a speciálisan erre használatos oszlop méretét, és az adszorbens (szilícium-dioxid) mennyiségét. Miután az oszlopot szárazon megtöltöttük, eluens ráöntésével tömörítettük, majd rátöltöttük a mintát, melyet előzőleg elegyítettünk az eluenssel. Kis részletekben öntöttünk az oszlopra eluent, mely végigfolyt az adszorbensen, és a minta alkotóit különböző sebességgel vitte magával. A kromatográfia gyorsítása érdekében vákuumot használtunk. A minta összetevői adszorpciós képességük szerint elkülönültek, frakciókat képeztek. Ezután VRK-val vizsgáltuk

meg, hogy mely frakciókban találhatóak az egyes komponensek (4. ábra).

Rotációs vákuumbepárlás

Miután oszlopkromatográfiával elkülönítettünk, majd VRK-val kimutattunk egy anyagot, a bepárlás következett, mely eljárás során az oldószer elpárologtatásával megkaptuk termékeinket. A gázok forráspontja alacsony nyomáson alacsonyabb, ezért a magas forráspontú oldószereket csökkentett nyomáson, meleg vízfürdőben forgatva szokták bepárolni vákuumszivattyúval. Az oldószer egy hűtőben lecsapódik, és egy szedőlombikban gyűlik össze (5. ábra).

Hatóanyagok kinyerése

Vanília

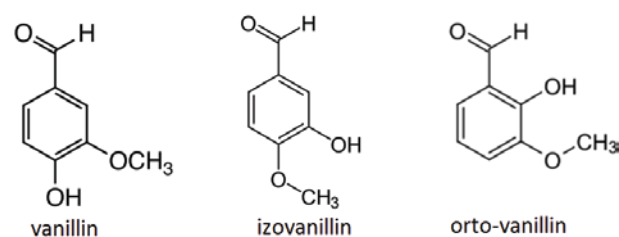
A természetes vanília kivonat néhány 100 vegyület keveréke, beleértve a vanillint is (6. ábra). A természetes vanília elérhetőségének szűkösége és költségessége miatt szintetikus előállítása hosszú ideje az érdeklődés középpontjában áll. Első laboratóriu-



4. ábra Oszlopkromatográfiához szükséges eszközök



5. ábra Rotációs vákuumbepárló

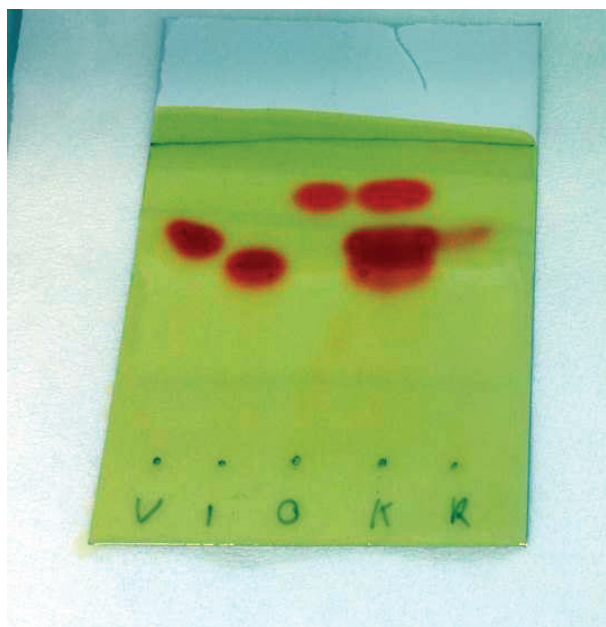


6. ábra A vanillin, izovanillin és az orto-vanillin molekulájának szerkezeti képlete

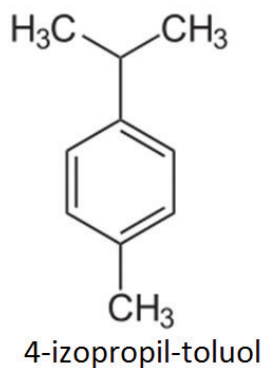
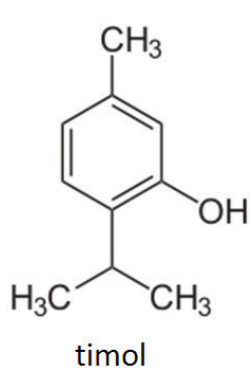
mi munkánk célja is ehhez volt köthető, ugyanis azt szerettük volna megállapítani, hogy a „bolti” vanília tartalmaz-e „eredeti” vanillint vagy csak annak valamelyik izomerét, az izovanillint vagy az orto-vanillint. Az ehhez szükséges folyamat azzal vette kezdetét, hogy egy darabka vaníliarúdból kinyertük a hatóanyagokat Soxhlet-extraktor segítségével, majd ezt követően VRK-s vizsgálatot végeztünk (7. ábra), amely során összehasonlítottuk a meg-lévő tiszta anyagainkat a kapott extraktumunkkal. A kísérletünk és vizsgálatunk eredményeként azt kaptuk, hogy a „bolti” vanília tartalmaz vanillint, az izomerjei nem kimutathatók VRK-val.

Kakukkfű

A kakukkfű erős fertőtlenítő és antimikrobiális ha-



7. ábra A bolti vaníliából kinyert minta és a tiszta vanillin-izomerek VRK felvétele



8. ábra A timol és a 4-izopropil-toluol molekula szerkezeti képlete

tású növény, mely e gyógyhatásait a leveleiben találhatók timolnak és 4-izopropil-toluolnak (*p*-cimén) (8. ábra) köszönheti. A kakukkfűvel való laboratóriumi munkánk célja az volt, hogy Soxhlet-extraktor segítségével metanollal megpróbáljuk kiextrahálni ezeket a vegyületeket a növényből. A kapott extraktumból (9. ábra) kereskedelmi forgalomban kapható timol és *p*-cimén segítségével VRK-val megállapítottuk, hogy a kakukkfű valóban tartalmazza a timolt, de a *p*-cimént csak valószínűleg olyan kis mennyiségben, hogy VRK-val nem tudtuk kimutatni (10. ábra).

Koriander és levendula

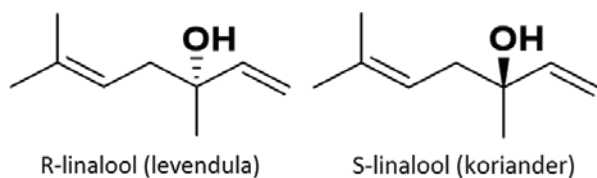
Bármennyire is hihetetlen, a koriander és a levendula ugyanazt az illatanyagot tartalmazza, csak a



9. ábra A kakukkfű extraktuma



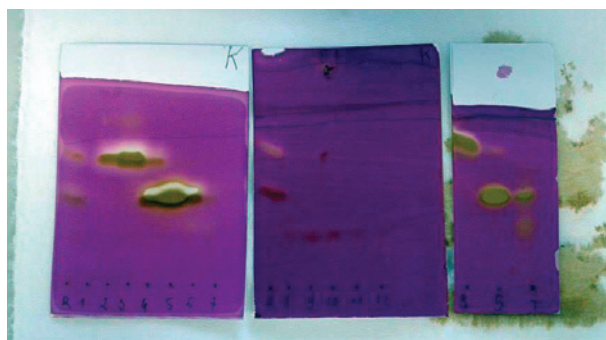
10. ábra A kakukkfű-extraktum és a tiszta hatóanyagok VRK felvétele



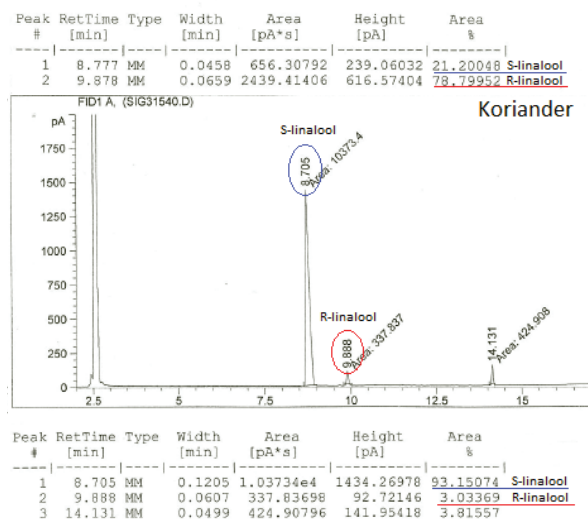
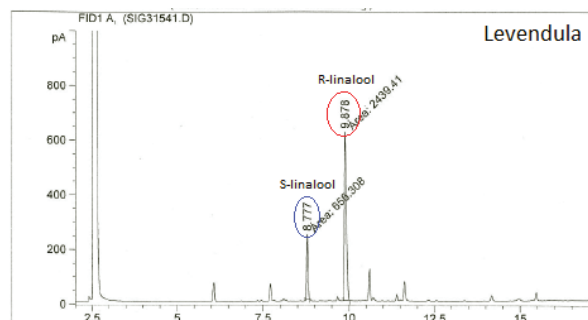
11. ábra Az R-linalool (levendula) és az S-linalool (koriander)

vegyület más optikai izomerjét. Az optikai izoméria akkor lép fel, ha egy szerves vegyületben egy telített szénatomhoz négy különböző ligandum kapcsolódik, és a vegyület nem szimmetrikus. Így két ún. enantiomert kapunk, melyek egymás tükörképei, de nem hozhatók fedésbe egymással. Ezek azonos fizikai és kémiai tulajdonságokkal bírnak, de a poláris fény síkját másfele forgatják, és élő szervezetben másféleképpen viselkednek. A korianderben és a levendulában lévő anyag a linalool. Ennek a poláris fény síkját jobbra forgató enantiomerjét R-linaloolnak (ebből van több a levendulában), a balra forgatót S-linaloolnak (korianderben van több) hívják (11. ábra).

Először a már sokszor alkalmazott extrakcióval kinyertük a hatóanyagokat (a koriandert előtte mozsárban összetörtük). Ezután oszlopkromatográfiával elkülönítettük a korianderben és a levendulában talált anyagokat. VRK-val megvizsgáltuk a frakciókat, amelyeket lúgos KMnO_4 oldattal elő is hívtunk (12. ábra). A legintenzívebb frakciókból vett mintákkal (12. ábra bal oldal, 3. és 5. frakció), illetve a laboratóriumban lévő tiszta linaloolal újabb VRK-t készítettünk (12. ábra jobb oldal), és megállapíthattuk, hogy melyik vándorlási távolság tartozik a linaloolhoz (az 5. pont). Ugyanezt megtettük a levendula-extraktumból elkülönített mintákkal is, így sikerült bebizonyítanunk, hogy a két növénynek ugyanaz a hatóanyaga. Ezután gázkromatográfiával megmértük, hogy hány százalékban tartalmazzák a minták az egyes



12. ábra A koriander-extraktum oszlopkromatográfiás módszerrel elkülönített frakcióinak VRK-s felvétele

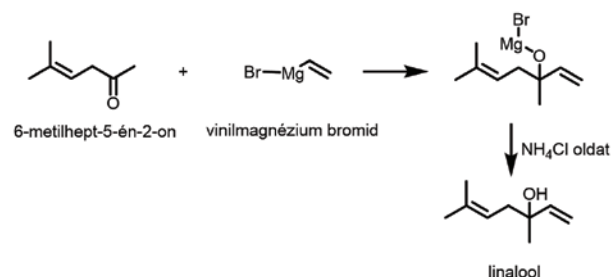


13. ábra A levendula- és koriander-hatóanyag összetételének vizsgálata gázkromatográfiával

enantiomereket: a levendula 78,8%-ban tartalmaz R-linaloolt, maradékban pedig S-linaloolt, a koriander pedig 93,2%-ban S-linaloolt, 3,0% R-linaloolt és 3,8% szennyeződést (13. ábra).

Hatóanyagok mesterséges előállítása

Grignard-reakció



14. ábra Grignard-reakció

Ezek után a hatóanyagok kinyeréséről átváltottunk a hatóanyagok mesterséges előállítására. Ez az iparban nagyon fontos eljárás, mivel a természetben nem található meg minden növényi hatóanyag elegendő mennyiségben. Az előbbi két növényben megtalálható linaloolt szintetikusán is előállítottuk



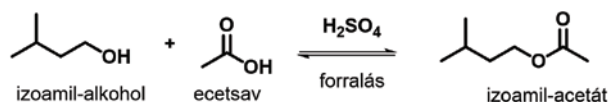
15. ábra Grignard-reakció felépítése

6-metilhept-5-én-2-on és vinilmagnézium-bromid (ún. Grignard reagens) reakciójával (14. ábra). Először is egy háromnyakú gömblombikot kihevítettünk, nitrogénnel átöblítettük, majd beleöntöttük a ketont. Ezután jeges fürdőn tartva tetrahidrofuránt (amely a Grignard-reagens oligomereit szétbontja) fecskendeztünk szeptumon keresztül a gömblombikba, és hozzáadtuk a vinilmagnézium-bromidot (15. ábra).

VRK-val vizsgáltuk, hogy milyen mértékben játszódott le a reakció, majd ammónium-klorid oldatot adtunk az eddigi oldathoz, mely hatására linaloolt kaptunk. Ezután rázótolcsérrel elválasztottuk a szerves és a vizes fázist, majd a linaloolt oszlopkromatográfiával különítettük el. Végül bepároltuk az oldószert, így közel 1 g tiszta linaloolt állítottunk elő.

Észterezési reakció

„Az illatok kémiája” nem is lenne illatos, ha a hét folyamán nem állítottunk volna elő valamilyen aromát. A rendelkezésünkre álló vegyszerekből kiindulva végül a banán illat mellett döntöttünk, melyet észterezéssel sikerült előállítanunk. Az észterezési reakcióhoz alkoholként izeamil-alkoholt (izopentil-alkohol), savként pedig ecetsavat használtunk. A reagenseket kénsav jelenlétében forraltuk (16. ábra). A reakció végbemenetelét VRK-val követtük. Többször ellenőriztük, hogy a kiindulási anyagok és az új anyag kimutathatók-e, majd végül rázótolcsér-



16. ábra Az izeamil-alkohol és ecetsav reakciója

rel elválasztottuk a szerves fázist a vizes fázistól. Munkánkat azzal zártuk, hogy a nekünk szükséges anyagot bepároltuk rotációs vákuumbepárló segítségével. A kapott aroma (17. ábra) annyira valóság-hű lett, hogy a laborban lévő összes ember kedvet kapott, hogy elfogyasszon egy-egy érett banánt.

Befejezés

A tábor során megismerkedtünk a legfőbb laboratóriumi módszerekkel és eszközökkel (extrakcióval, kromatográfias módszerekkel és vákuumbepárló használatával), és lehetőségünk volt olyan anyagokkal dolgozni, amikkel a hétköznapi életben is találkozunk. Foglalkoztunk hatóanyagok kinyerésével (vanília, kakukkfű, koriander és levendula hatóanyagaival), és szintetikus előállításukkal (Grignard-reagenst felhasználva linaloolt, észterezésével pedig banánésztert állítottunk elő).

Ez a tábor egy hatalmas lehetőség és egy életre szóló élmény volt mindkettőnk számára, ezután majd bárhol is találkozunk ezekkel az illatokkal, a laboratóriumi munka fog eszünkbe jutni.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnénk köszönetet mondani témavezetőinknek, Ferenczi-Palkó Robertának és Fegyverneki Dánielnek, illetve munkatársaiknak a sok segítségért és a megszerzett tudásért, valamint Lendvayné Győrik Gabriellának, aki megszervezte a kutatótáborot. Végül pedig szeretnénk megköszönni az MTA Természettudományi Kutatóközpontjának, hogy biztosították munkánk feltételeit.



17. ábra A reakció végterméke: az izeamil-acetát („banán illat”)

Kétdimenziós kémia

Balogh Ádám

Szerb Antal Gimnázium, Budapest

Pósa Szonja Polett

Bethlen Gábor Református Gimnázium, Hódmezővásárhely



témavezetők:

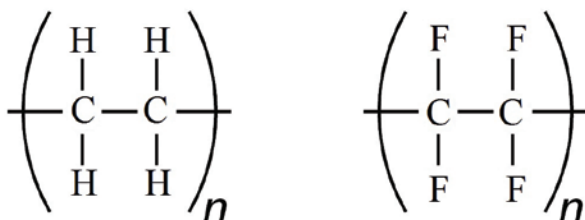
Dr. Klébert Szilvia és Dr. Mohai Miklós

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Anyag- és Környezatkémiai Intézet

Bevezető gondolatok a műanyagokról

Napjaink egyik legmeghatározóbb és legtöbbet használt anyaga a műanyagok. Népszerűségét kémiai inertségének, olcsó előállításának és széleskörű felhasználási területeinek köszönheti.

Ezen szerves polimereknek rengeteg típusát ismerjük: pl. PE (polietilén), melynek egyik legnagyobb felhasználója a csomagolóipar vagy épp a jó vegyszer- és hőállósággal rendelkező PTFE (poli-tetrafluor-etilén), melyet a tapadásgátló tulajdonsága miatt serpenyők bevonására használnak.



1. ábra A polietilén és a poli-tetrafluor-etilén szerkezete

A kutatótáborban PTFE-t és HDPE-t (nagy sűrűségű polietilén) vizsgáltunk. E két műanyag erősen víztaszító (hidrofób) tulajdonsággal rendelkezik. Munkánk alatt ezen anyagokat témavezetőink irányításával hidegplazmával kezeltük, ezzel a kötésekbe beépülő oxigénatomoknak köszönhetően vízkedvelő (hidrofil), nedvesíthető felület jött létre.

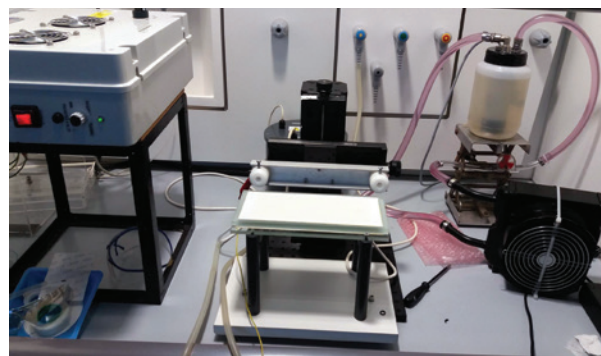
A felületmódosításról

Bármely műanyag tulajdonságait, így a nedvesíthetőségét, keménységét, biokompatibilitását vagy épp kopásállóságát felületkezeléssel tovább tökéletesíthetjük. Ilyenkor az anyag tömbi tulajdonsá-

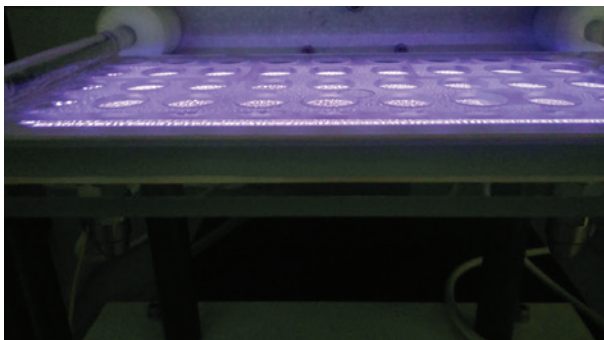
gai nem változnak, csak a környezettel közvetlenül érintkező vékony réteg fizikai és kémiai tulajdonságai.

A felületmódosítás elvégzéséhez igen sokféle módszer áll rendelkezésre. A Plazmakémiai Kutatócsoportban lehetőséget kaptunk arra, hogy megismerhessük, hogyan történik az atmoszférikus hidegplazma kezelés.

A plazma ionizált gáz, melynek sajátossága, hogy elektromos töltéssel rendelkező, valamint semleges részecskéket is tartalmaz, ebből fakadóan az összetétele igen változatos. Termodinamikai szempontból nézve kétféle plazmát különböztethetünk meg: az egyensúlyi, ún. melegplazma és a nem egyensúlyi, ún. hidegplazma. Utóbbiban az elektronok hőmérséklete jelentősen magasabb a plazma más, általában szobahőmérsékletű alkotórészeinél. A magas elektronhőmérséklet növeli a kémiai reaktivitást, emiatt képes az anyag felületét



2. ábra A DBD plazma készülék



3. ábra DBD plazma készülék működés közben

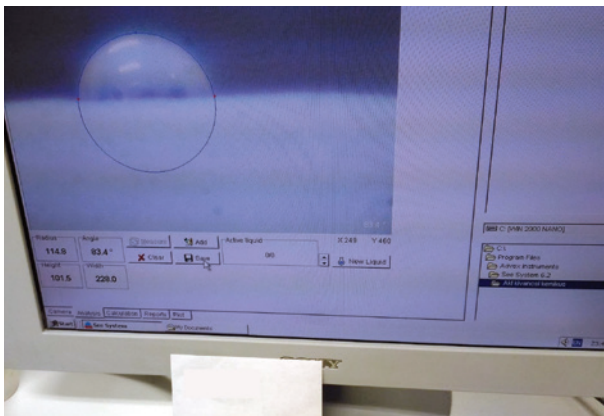
kezelné. A hidegplazmás kezelés felületmódosító hatása mindössze 10 nm vastagságban érvényesül. A hidegplazmát elektromos úton, az ún. DBD (Dielectric Barrier Discharge) plazmaeljárás útján hozzák létre.

A DBD plazma készülék egy sík elrendezésű rendszer, amelynek alapja egy alumínium-oxid szigetelőréteg, benne egymástól elszigetelve helyezkednek el az elektródák. A feszültséget pulzálva adva az elektródákra, közöttük mikrokisülések jelennek meg, a kisülés maga az ionizált gáz. Ilyen módon már atmoszférikus nyomáson is létrehozható a hidegplazma, ami a vákuumban történő kezeléseknél kevesebb energiát igényel, tehát környezetbarát eljárás.

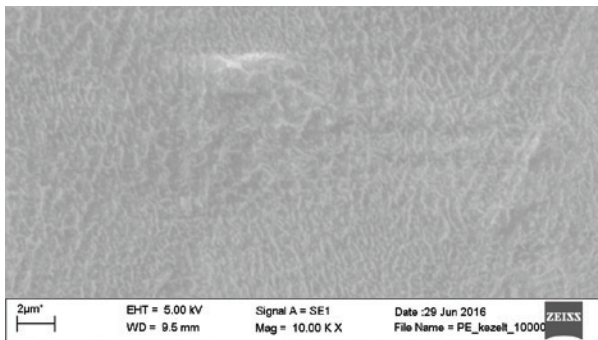
Analitikai vizsgálatok

Peremszögmérés

A hidegplazmás kezelést követően a kontroll és a kezelt műanyag minták felületének nedvesíthetőségét vizsgálatuk peremszög méréssel. Megállapítottuk, hogy a kezeletlen mintákhoz képest a kezelt mintákon mérhető peremszög értékek jelentősen kisebbek lettek, vagyis mind a PTFE, mind a HDPE esetében a kezelt anyag felülete hidrofílabb lett.



4. ábra Kezelt műanyagok peremszögmérése



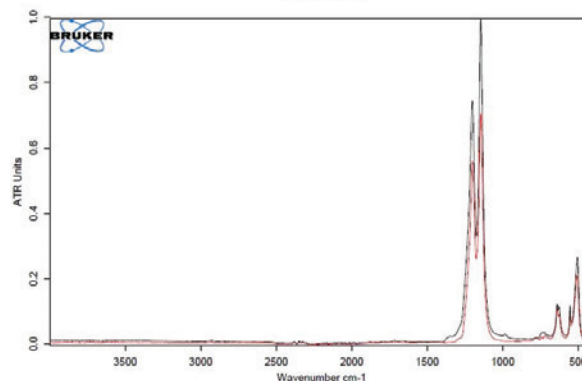
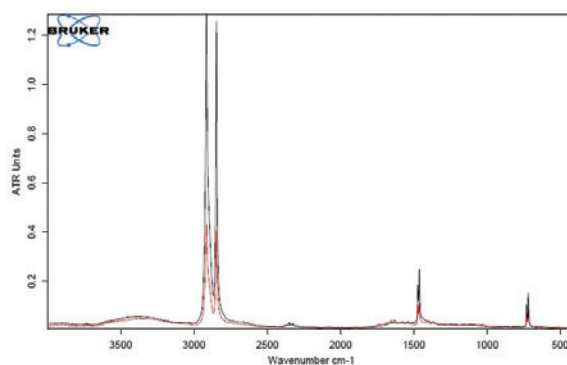
5. ábra A plazmakezelt polietilén pásztázó elektronmikroszkópos képe

SEM

Vizsgálódásainkat folytatva pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM-mel) tanulmányoztuk a felületeket. Az eszköz segítségével kiértékelt képek alapján megállapítottuk, hogy a kezelt minták felületén valamelyest látszódtak a kezelés nyomai. A felszín domborzatának csekély mértékű megváltozásán kívül a felület módosulásának nem láttuk jelét.

IR spektroszkópia

A következő megismert vizsgálati módszer az infravörös spektroszkópia volt. A kezeletlen mintákról készült spektrumokon megtaláltuk a PTFE-re jellemző C-F, illetve a HDPE-nél a C-H kötéseknek megfelelő csúcsokat. Mivel újabb csúcsokat a ke-

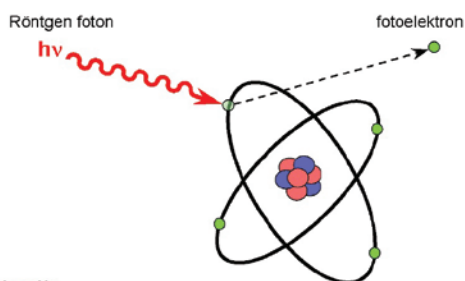


6. ábra A kezelt (piros) és a kezeletlen (fekete) PE és PTFE infravörös spektrumai

zelt minták spektrumain sem láttunk, megállapítottuk, hogy felületi átalakulásra utaló jelet IR spektroszkópiával nem találtunk.

XPS

Az előzőekben bemutatott analitikai méréseket követően a röntgenfotoelektron spektroszkópia (XPS) módszer alkalmazása vált szükségessé. A berendezés működése a fotoeffektus jelenségén alapul: Ha kellően nagy energiájú fotonokból álló elektromágneses sugárzással – ebben az esetben röntgensugárzással – megvilágítunk egy atomot, akkor azt elektronok hagyhatják el. A gerjesztő foton energiája két célra fordítódik: egyrészt az adott atomból történő ún. fotoelektron emittálásra, másrészt a kilépő fotoelektron kinetikus energiájára.



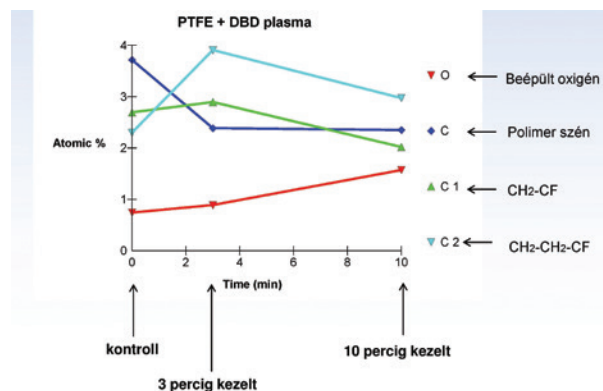
Forrás: Mohai Miklós

7. ábra A fotoeffektus röviden

Az emittált fotoelektronok egy elektrosztatikus félgömb analízátorba terelődnek, s az elektromos tér hatására az eltérő kinetikus energiával rendelkező fotoelektronok különböző sugarú pályákon haladnak tovább, elérve az analízátor végét, az elektron detektort. Ezek alapján érthető, hogy a röntgen-fotoelektron spektrométer működéséhez elengedhetetlen az ultranagy vákuum jelenléte, hiszen a minta bevezetését és fotoionizációját követően az elektronok kinetikus energiájának nem szabad



8. ábra az általunk használt XPS készülék



9. ábra Hidegplazmával kezelt PTFE felületi összetétele (atom%) a kezelési idő függvényében

megváltozni. Ezt úgy tudjuk elérni, hogy alacsony nyomás alkalmazásával az elektronok ütközési valószínűségét minimalizáljuk.

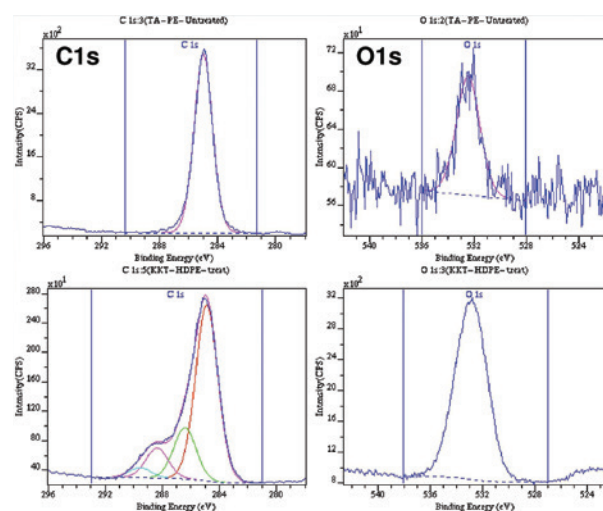
Az XPS készülékkel történt mérés eredményeképpen egy spektrumot (kötési energiákhoz tartozó elektronintenzitások összessége) kapunk, melyből következtethetünk a mintában előforduló elemekre és azok kémiai állapotára.

A kezelt műanyagok vizsgálata XPS-sel

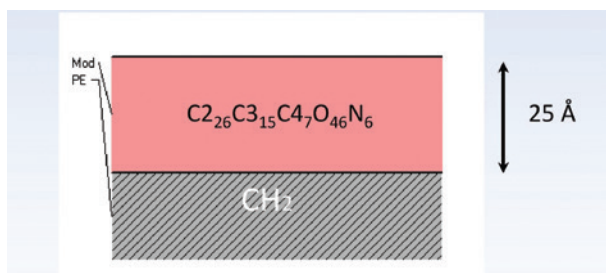
Az XPS a többi analitikai eszközzel ellentétben képes volt a felület kvalitatív és kvantitatív vizsgálatára.

A PTFE (poli-tetrafluor-etilén)

A PTFE esetében jól látható, hogy a felületen lévő CF_2 láncok egy része felbomlott és új kötések alakultak ki. A légkörből oxigén épült be, ennek



10. ábra A polietilén (kezeletlen felső sor; kezelt alsó sor), C1s és O1s fotoelektron vonala hidegplazmás kezelés előtt és után



11. ábra A kezelt felületi réteg vázlata

köszönhetően a műanyagot sikerült hidrofilabb tulajdonsággal felruházni, amit a peremszögmérés is bizonyított.

A HDPE (polietilén)

A polietilén esetében is jól látszik, hogy a kezelés után a CH_2 kötések egy része felszakad, és új kötéstípusok jönnek létre. A spektrumon jól látható, hogy a kezeltetlen műanyag felületén nagyon kevés oxigén található, mely szennyeződésnek tulajdonítható. Ám a kezelt polimer esetében már szennyeződésről nem beszélhetünk, ugyanis jól látható az intenzív oxigén vonal, valamint a beépült oxigén aránya is jelentős mértékű.

Az XPS nemcsak a felületi kvantitatív és kvalitatív analízisre alkalmas, hanem Mohai Miklós témavezetőnk által kidolgozott XPS MultiQuant program – mely mögött komoly matematikai egyenletek sokasága áll – segítségével következtethetünk a kezelt réteg vastagságára, mely a mi mintáink esetében kb. 25 Ångströmrre tehető. Ez a rétegvastagság összemérhető az XPS módszer észlelési mélységével. Ezzel egyben magyarázatot kaptunk arra, hogy az infravörös spektroszkópia, amelynek észlelési mélysége csaknem ezerszer nagyobb, mint az XPS-é, miért nem volt alkalmas a felületi változások kimutatására.

Következtetés - konklúzió

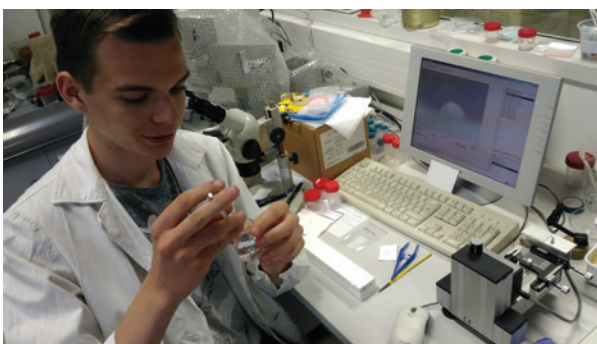
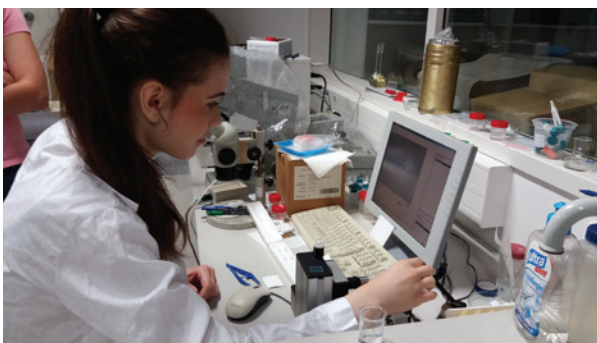
A HDPE és a PTFE felületeit sikeresen kezeltük, amely során a polimert hidrofilabb tulajdonsággal ruháztuk fel. A módosítást sikeresen kimutattuk XPS-sel, valamint meghatároztuk a kezelt felület összetételét, az összetevők mennyiségét és vas-

tagságát. Az általunk kipróbált analitikai eszközök közül csak az XPS tudta ezeket a tulajdonságokat meghatározni.

Személyes gondolatok, köszönetnyilvánítás

A kutatótábor rendkívüli élményekkel gazdagította életünket. Megismerkedhettünk a polimerek felületkezelésével, és különféle analitikai műszerek működésének alapjaival.

Betekintést nyerhettünk egy kutatási projekt megvalósításának menetébe, s megismerkedhettünk a kutatói lét örömeivel és nehézségeivel. Az MTA-n töltött idő megerősített minket abban, hogy pályafutásunkat a természettudományi-kutatói vonalon képzeljük el. Nagyon hálásak vagyunk, hogy részesei lehettünk a kutatótábornak. Köszönjük a sok-sok segítséget témavezetőinknek, Mohai Miklósnak és Klébert Szilviának, valamint Gulyás Lászlónak (*XPS labor*) és Németh Péternek (*SEM labor*), továbbá köszönjük a szervezést Lendvayné Győrik Gabriellának.



12. és 13. ábra A szerzők munka közben

Polimerek – Az óriásmolekulák csodálatos világa

Czakó Áron

Nyíregyházi Krúdy Gyula Gimnázium

Valtner Tamás

Dositej Obradović Gimnázium és Közgazdasági Iskola, Topolya, Szerbia



Témavezetők:

Dr. Szabó Ákos és Bencskó György

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

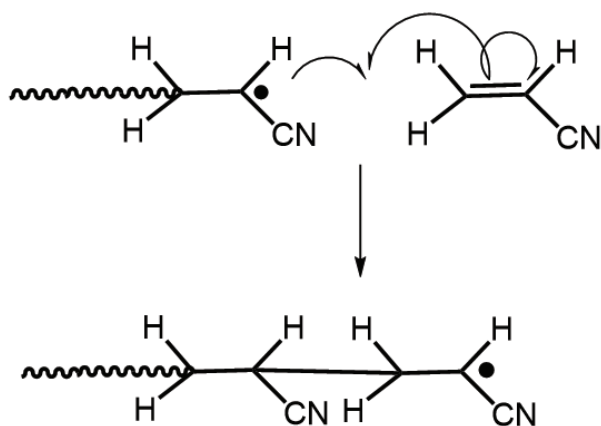
A tábor előtt a polimerekre gondolva szürke PVC padlók, hosszú, narancsszínű csövek és gumikacsák jutottak az eszünkbe, a modern élet elengedhetetlen és mégis - valamilyen módon - kissé visszataszító teremtményei. Azért sejtettük, hogy nem egészen ezekkel foglalkozik a polimer kémia, de ismerjük el, az ember nehezen birkózik meg azokkal a félreértésekkel és sztereotípiákkal, amik az évek során beleivódtak az agyába, különösen annak sötét és kevésbé látogatott zugaiba. Valami újat szerettünk volna látni, és a címben a polimerek *világát* ígérték nekünk, így hát úgy döntöttünk, elindulunk erre a kalandra...

A laborba belépve annak hangulata azonnal magával ragadott minket, pedig „csak” egy szokványos kutatólabor kellékeit láttuk magunk körül: berendezéseket, amiket sohasem láttunk

még, vegyszereket, amikről még csak nem is hallottunk eddig és a legfontosabb, akinek a kezében mindezek életre kelnek: a Kutató.

Munkánk a felsoroltak megismerésével vette kezdetét. Témavezetőink elmagyarázták nekünk különböző laboreszközök működését; megtudhattuk, hogyan működik az elszívófülke, a táramérleg, a kesztyűs doboz, a rotációs bepárló készülék, a spektrofotométer, az NMR berendezés és számtalan egyéb műszer, készülék. Megtanították nekünk a munkánkhoz szükséges elméleti alapokat, és eközben megismerhettük őket, a kutatókat is. Sokszor elképzeltük már, milyen lehet egy laborban dolgozni, de azt soha nem gondoltuk volna, hogy az izgalom ellenére, amit az új dolgok megismerése okoz, ilyen közvetlen és barátságos hangulat uralkodhat.

Mindezek után megkezdhattuk a gyakorlati munkát: akrilnitril monomert polimerizáltunk különböző módokon. Ez azt jelenti, hogy az akrilnitril kisméretű, egyforma molekulái egy „óriásmolekulává” (polimer) kapcsolódtak össze (1. ábra). A polimerizációhoz először meg kellett tisztítani az akrilnitril monomert, hogy eltávolítsuk belőle a spontán polimerizációt megakadályozó inhibitorokat. Ezt a műveletet úgy végeztük el, hogy a monomert egy bázisos alumínium-oxid port tartalmazó oszlopon eresztettük át, illetve vákuumdesztillációt alkalmaztunk. Ezután a tisztított monomerünkhöz hozzáadtuk az iniciátort, a polimerizáció kezdőlépését indító molekulát. Ez jelen esetben ammónium-perszulfát volt, amely tetrametil-etilén-diamin segítségével



1. ábra Az akrilnitril gyökös polimerizációjának sematikus ábrázolása



2. ábra A vákuumdesztilláló összeállítása

megindította a láncnövekedést. Ez lényegében úgy történt, hogy az iniciátormolekula fény hatására bomlott, így egy gyök, vagyis párosítatlan elektront tartalmazó molekula keletkezett, amely úgy próbált stabilizálódni, hogy kötést alakított ki egy akrilnitril molekulával. Így azonban erre került rá a párosítatlan elektron, amely lehetővé tette, hogy az előző monomerhez még egy monomer kapcsolódjon, és ez így folytatódott egészen addig, amíg a párosítatlan elektron meg nem találta a párját egy másik gyökön, így lezárva a folyamatot (2. ábra).

Egy másik eljárással, élő polimerizációval is elvégeztük a polimerizációt. Ezzel a módszerrel a polimerizációs szakasz lezáródását tudjuk szinte a végtelenségig elhúzni, illetve, ha be is következik a lánczáródás, a kötést fel tudjuk szakítani, és tovább folytatódhat a polimerlánc építése. Itt a monomerünkhöz és iniciátorunkhoz (etil-2-bromoizobutirát) Cu^0 katalizátort és Me_6TREN komplexképzőt adtunk.

Az elsőt, a gyökös polimerizációt kb. 10 percig végeztük, a második, az élő polimerizáció pedig egész éjjel tartott. Mindkét reakció típust



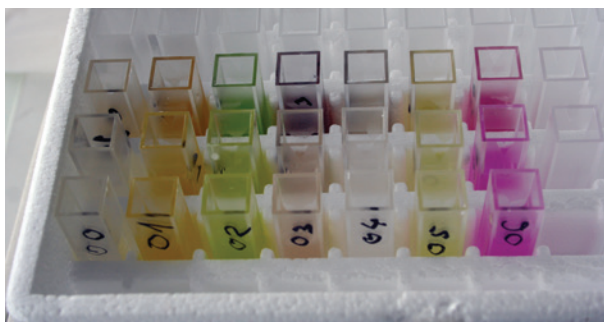
3. ábra A polimerünk

szobahőmérsékleten, keverőbabával kevertetve hajtottuk végre. A reakciókat légmentesen lezárt, átnitrogénezett üvegekben végeztük.

A keletkezett vegyületek vizsgálatához NMR-t használtunk. Végre megpillanthattuk az egyik legfontosabb analitikai eszközt, az NMR-t, amiről eddig csak ködös kép élt bennünk. Hiába olvastunk már többször a műszerről, mégis egészen más volt a valóságban. Annak ellenére, hogy igazából úgy nézett ki, mint egy közönséges villanybojler, mégis teljesen lenyűgözött minket a látványa, és most végre nagy vonalakban megismerhettük a működését is.

A kapott polimer oldatok már ránézésre is különleges tulajdonságokat mutattak. Az egyiknek narancssárgás színe volt, a másik a zöld egy árnyalatával bírt. Az oldatokat NMR-rel vizsgálva megtapasztalhattuk a kísérletezésnek azt a furcsaságát, hogy sohasem lehet tudni, mire számíthatunk, a kapott jelek ugyanis nehezen térhetek volna el jobban a várttól. Mint később kiderült, ennek oka az volt, hogy a keletkezett polimerünk nem oldódott hagyományos NMR oldószerekben, mint pl. deuterált kloroform, deuterált víz, deuterált metanol, deuterált tetrahidrofurán. (A deuterált jelző azt jelenti, hogy az oldószer molekuláiban a hidrogént deutérium helyettesíti.) Végül aztán deuterált dimetil-szulfoxid oldószer segítségével sikerült igazolni a polimer létrejöttét.

A homopolimerek előállítása után megpróbálkoztunk kopolimerek előállításával, melyeket két vagy több fajta monomer épít fel. Akrilnitrilből és dimetil-akrilamidból két fajta kopolimert állítottunk elő gyökös polimerizációval, az egyik egyenlő, a másik 1:9-es arányban tartalmazott akrilnitrilt és dimetil-akrilamidot. Talán az egész hét alatt, amit a kutatóközpontban töltöttünk, ez a kísérlet adta a leglátványosabb eredményt. A gyors reakció során mindkét esetben térhálós polimer képződött, melyek állagát leginkább a kocsonyáéhoz lehetett hasonlítani. A reakció gyorsaságát az mutatja a legjobban, hogy a mágneses keverőbaba egyik pillanatról a másikra megállt az edényben. A keletkezett anyag (3. ábra) nem oldódott semmilyen oldószerben, csupán megduzzadt az oldószerek hatására. A jelenség érthetővé válik, ha magunk elé képzeljük a polimer szerkezetét, melyben a láncok több helyen is összekapcsolódnak, és úgy töltik ki a teret, mint egy térbeli háló. Duzzadáskor az oldószer behatol a polimerbe, és „széthúzza” annak szerkezetet.



4. ábra A fém sók oldatai

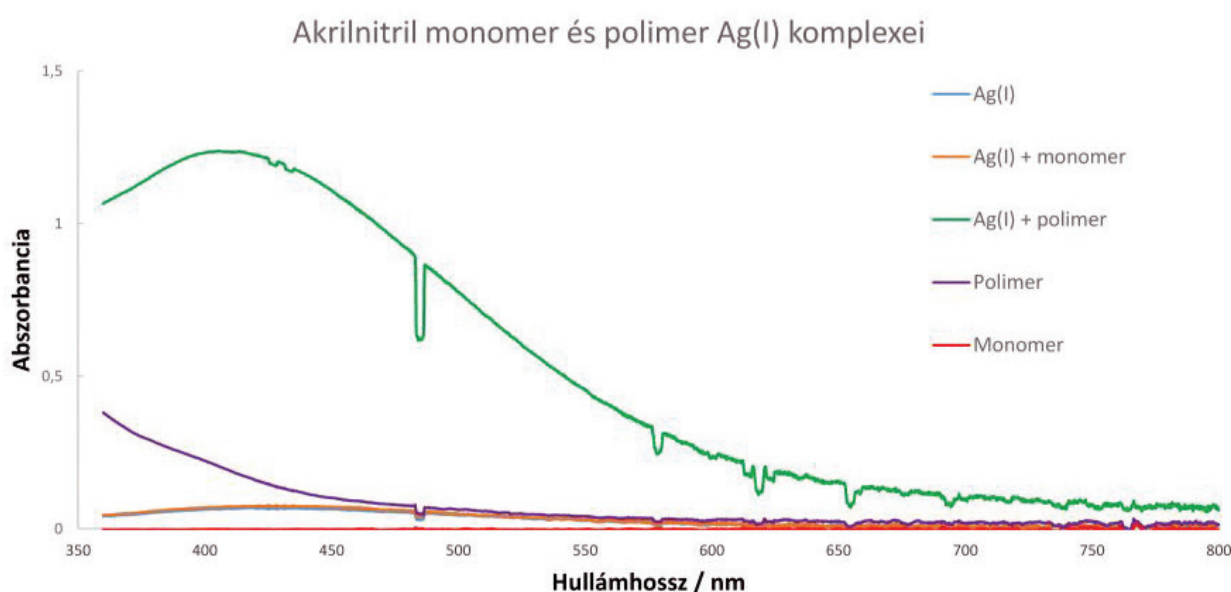
Érdekes eredményeket adott a poli-akrilnitril fémionokkal alkotott komplexeinek vizsgálata. Ennek során az előzőleg gyökös polimerizációval előállított polimerünket dimetil-sulfoxid oldószerben oldottuk, majd ehhez adtuk hozzá a különböző fémionok (Cu(II), Ag(I), Fe(III), Mn(II), Ni(II), Co(II)) azonos koncentrációjú oldatait (4. ábra). Arra voltunk kíváncsiak, hogy kapcsolatba lépnek-e a fémionok a polimer vagy a monomer molekulákkal. Spektrofotométerrel végeztünk vizsgálatokat. A látható fény hullámhossztartományában tanulmányoztuk az abszorbancia, vagyis a fényelnyelés változásait, és ebből következtettünk a molekulák szintjén történt változásokra. Mértük a fém sók-, a monomer-, a polimer oldatainak, valamint a fémion-monomer és a fémion-polimer rendszerek abszorbanciáját. Ha a monomerünk vagy a polimerünk kémiai kapcsolatba lépett a fémionokkal, akkor a fémion-monomer vagy a fémion-polimer oldatok abszorpciós spektrumának különböznie kellett a külön a fémiont és külön a monomert, illetve a

polimert tartalmazó oldatok abszorbanciájának összegétől. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a fémionok közül az Ag(I) ion lépett kémiai kapcsolatba a polimerünkkel, hiszen hatására nagyobb mértékben nőtt meg a polimer oldat abszorbanciája, mintha egyszerűen összegződött volna az oldatok fényelnyelése. (5. ábra).

A tábor végén egy rövid előadás keretében bemutathattuk az eredményeinket. Érdekes volt tapasztalni, hogy azzal sikerült igazán megérteni a munkánkat, hogy megpróbáltuk érthetően elmondani az egy hét alatt tanultakat, tapasztaltakat. Rákényszerültünk arra, hogy elgondolkodjunk olyan kérdéseken is, amik a témával nem foglalkozó emberekben fölmerülhettek az óriásmolekulákkal kapcsolatban.

A szeptemberi estéken, amikor ezt a beszámolót írjuk, boldogan gondolunk vissza azokra a napokra, melyeket olyan emberek társaságában töltöttünk, amilyenekké egy nap mi is válni szeretnénk. Témavezetőinknek köszönhetően teljesen új megvilágításba került a tudományról, a polimerekről és a kutatókról bennünk korábban kialakult kép.

Szeretnénk köszönetet mondani témavezetőinknek, Bencskó Györgynek és Szabó Ákosnak, hogy egy életre megszerettették velünk a polimerek világát, Lendvayné Győrik Gabriellának, hogy megszervezte ezt a felejthetetlen tábort és az MTA Természettudományi Kutatóközpont Anyag- és Környezetkémiai Intézetnek, hogy lehetővé tette és támogatta a kutatótábort.



5. ábra Az Ag(I) ionok abszorbanciájának megváltozása a polimerrel való kölcsönhatás miatt

Vegyianyagok előállítása lignocellulózból

Gräff Ádám Tamás

ELTE Radnóti Miklós Gyakorló Gimnázium, Budapest

Hermann Regina

Vörösmarty Mihály Gimnázium, Budapest



émavezetők:

Rosenbergerné Dr. Mihályi Magdolna, Dr. Barthos Róbert és Balla Áron

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Anyag- és Környezetkémiai Intézet

Az emberiség olyan ütemben használja fel a fosszilis energia- és szénforrásait, hogy a vegyiparban egyre inkább előtérbe kerül az alternatív, megújuló források kutatása és alkalmazása. A mi kutatásunk témája is ezen a koncepción alapszik, mert az alatt az egy hét alatt, amit az MTA Természettudományi Kutatóközpontban töltöttünk, a lignocellulózból nyerhető levulinsav (4-oxo-pentánsav, LA) heterogén katalitikus hidrokonzverziójával foglalkoztunk SiO_2 hordozós kobalt katalizátor használatával. A kutatás célja a katalizátor szerkezete és a katalitikus viselkedés közötti összefüggések feltárása volt. Megismertedtünk továbbá katalizátor jellemzési módszerekkel (mint pl. hőmérséklet-programozott redukció, TPR), valamint a reakcióban képződő termékelegy analízisét korszerű, gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) módszerrel végeztük.

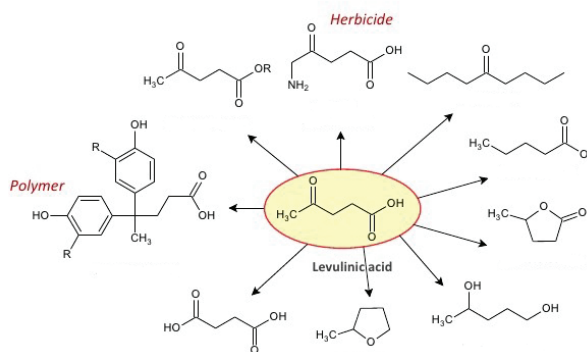
1. Elmélet

A lignocellulóz ligninből, hemicellulózból és cellulózból épül fel. Emberi fogyasztásra alkalmatlan mezőgazdasági, erdészeti, könnyű- és élelmiszeripari hulladékok fő összetevője a lignocellulóz. Az évente képződő $1,7 \cdot 10^{11}$ tonna növényi biomasszának elenyésző mennyiségét, csak 3 %-át használjuk fel. Ez egy nagyon alacsony érték annak a fényében, hogy egy nagyon potens megújuló szénforrásról beszélünk. A cukoregységeket tartalmazó vegyületek-ből több lépésben sav katalizátor segítségével (pl. HCl , H_2SO_4) többek között levulinsavat lehet nyerni, ami egyike annak a 12 platform molekulának,

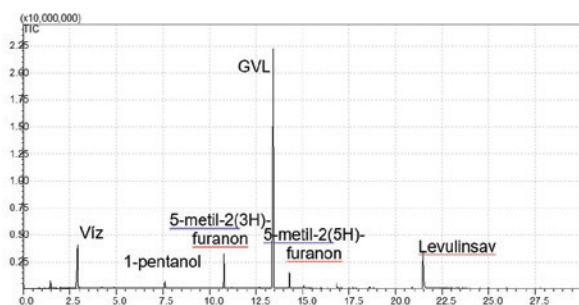
melyek növényi biomasszából állíthatók elő. Ezek a platform molekulák nevüket onnan kapták, hogy nagyon egyszerűen lehet őket átalakítani különböző egyéb vegyi anyagokká, mert magas a reakcióképességük. A mi célunk a levulinsavval az volt, hogy hidrokonzverzió által, telített, alacsony oxigén tartalmú molekulákat kapjunk, amelyek így már alkalmasak bioüzemanyagnak (gamma-valerolakton, GVL), vagy oldószernek (2-metil-tetrahidrofuran, 2-MTHF).

2. A reakció

Az általunk vizsgált reakció kétlépéses, egy hidrogén addícióval, és egy vízmolekula kilépésével jár. Ez kétféle sorrendben történhet, amennyiben először a negyedik szénatomon található oxo-csoport hidrogéneződik, a folyamat köztes terméke a 4-hid-

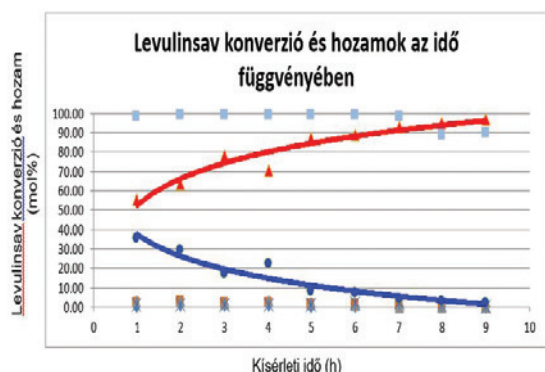


1. ábra Levulinsavból előállítható vegyületek



2. ábra Co/SiO₂ katalizátoron az LA hidrokonverziójában, a kísérlet 8. órájában képződő folyadékfázisú termék kromatogramja (T:200°C, p:30 bar, téridő: 1gkat./gLA*h)

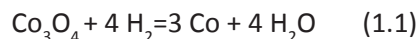
roxi-pentánsav, amely vízkilépéssel GVL gyűrűvé záródik. A második reakcióútnál a reakciók sorrendje felcserélődik. Először lép ki a víz, és telítetlen gyűrűs angelika laktonok képződnek, majd a lakton gyűrűt feltöltjük GVL-lé. Kobalt katalizátornál a második reakcióút a jellemzőbb, ezeknek a termékeit (alfa- és béta- angelika lakton) megtaláltuk a mintában, míg a 4-hidroxi-pentánsav nem vagy csak a kimutatási küszöb alatt volt megtalálható. A vizsgált katalizátoron a reakció kezdeti szakaszában a GVL gyűrűnyitással tovább hidrogéneződik, az egyik útvonalon pentánsav képződik, míg a másikon 1,4-pentándiolon keresztül egy újabb vízkilépéssel 2-MTHF-et kapunk. Ez a reakcióút az első 4 órában jellemző mellékterméke is volt a reakciónak. A katalizátor felületi sajátosságai (diszperzitás, koksizlerakódás) a reakció során változtak, ami szelektivitás változást eredményezett. További lehetséges termék még az 1-pentanol és a 2-pentanol. Ezek csak kis mennyiségben fordultak elő, főleg az első 2-3 órában, amikor még a 2-MTHF is tovább hidrogéneződött.



3. ábra A levulinsav konverziója (kék négyzet) és a GVL (piros háromszög), valamint a 2-MTHF (kék kör) hozama az idő függvényében.

3. A katalizátor

8,1 tömeg% Co-tartalmú szilícium-oxid hordozós katalizátorral dolgoztunk. A Co-oxid redukálhatóságát hidrogénnel végzett TPR (temperature-programmed reduction, hőmérséklet-programozott redukció) módszerrel vizsgáltuk. A katalizátort először 550 °C-on oxidáltuk, majd 20 ml/min 10% H₂/He áramban redukáltuk, miközben a hőmérsékletet 10°C/min sebességgel emeltük szobahőmérsékletre 600 °C-ig. A redukció során a Co-oxid fém kobalttá alakul az alábbi egyenlet szerint:



Redukció közben a 10% H₂/He gázkeverék hidrogén koncentrációja lecsökken, megváltozik a gáz-elegy hővezetőképessége a kiindulásihoz képest. Ezt a változást detektáltuk egy számítógéphez kapcsolt hővezetőképességi detektorral. A TPR görbéből jól látszott, hogy a Co₃O₄ redukciója 250 °C-on kezdődik, a redukció sebessége 350-360 °C-on a legnagyobb, majd 420 °C-on a redukció befejeződik. A hidrogénfogyásból és a minta mennyiségéből meghatároztuk a redukció mértékét (kb. 95 %), valamint a TPR görbe lefutásából a katalitikus mérés előtt alkalmazandó redukciós hőmérsékletet (440°C).

4. Termékelemzés gázkromatográfiás-tömegspektrométerrel

A levulinsav konverzióját folyamatos, átáramlásos, integrális csőreaktorban végeztük hidrogén jelenlétében 20 bar nyomáson. Egy 10 mm átmérőjű fémreaktorba 1,134 g 0,31-0,67 mm szemcseméretű Co₃O₄/SiO₂ mintát helyeztünk két kvarcág közé, és H₂-áramban (50 ml/min) aktiváltuk 440°C-on, 2 órán keresztül. Másnap a reaktort 200°C-ra fűtöttük, és megkezdtuk az LA beadagolását 1 ml/h sebességgel, folyadékpumpa segítségével. Az állandó hidrogén áramot (50 ml/min) tömegáramlás-szabályozóval biztosítottuk.

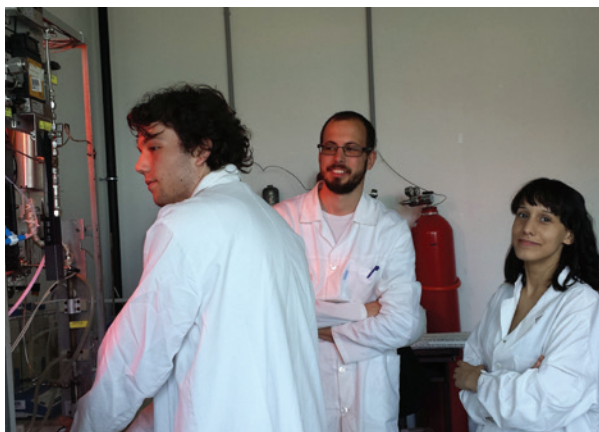
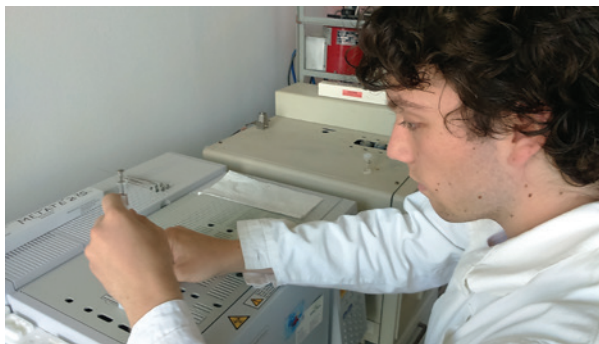
A vizes hűtőben összegyűlt termékből óránként mintát vettünk, tömegét megmértük, összetételét gázkromatográfiás-tömegspektrométerrel (GC-MS) határoztuk meg. Nyolc mintát vettünk, és az adatokból kiszámoltuk az LA konverziót, és a GVL, valamint a 2-MTHF hozamát, és az így kapott értékeket az idő függvényében ábrázoltuk.

A 3. ábrán látható, hogy kezdetben a GVL-en kívül 2-MTHF is képződött, de az idő teltével a reakció GVL-re való szelektivitása nőtt, a végére már a

90%-ot is meghaladta. A konverzió a reakció egész ideje alatt közelítette a 100%-ot, csak az utolsó két órában csökkent 8-10 %-kal. Fontos tényező, hogy a termékek magas százalékban tartalmazzák az előállítani kívánt anyagot, ami ez esetben a GVL volt. Megállapíthatjuk, hogy levulinsavból Co/SiO_2 katalizátoron 200 °C-on, 20 bar nyomáson, hidrogén jelenlétében magas konverzióval (95-99%) és nagy szelektivitással (95%) állítható elő GVL.

5. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk témavezetőinknek, Rosenbergné Mihályi Magdolnának, Barthos Róbertnek és Balla Áronnak, hogy egy hétig betekintést nyerhettünk egy aktuálisan folyó kutatásba, és megismerkedhettünk és kezelhettünk katalizátorok jellemzéséhez szükséges berendezéseket. Külön köszönjük Novodárszki Gyulának, hogy megtervezte az egész heti kísérletsorozatunkat. A hétköznapiakon folyó délelőtti labormunka mellett, hálásak vagyunk Gabi néninek és a többi szervezőnek az az után következő változatos programokért, amik lehetőséget adtak arra, hogy a többi táborozóval és kutatási témáikkal is megismerkedhessünk.



4., 5. ábra Munka közben

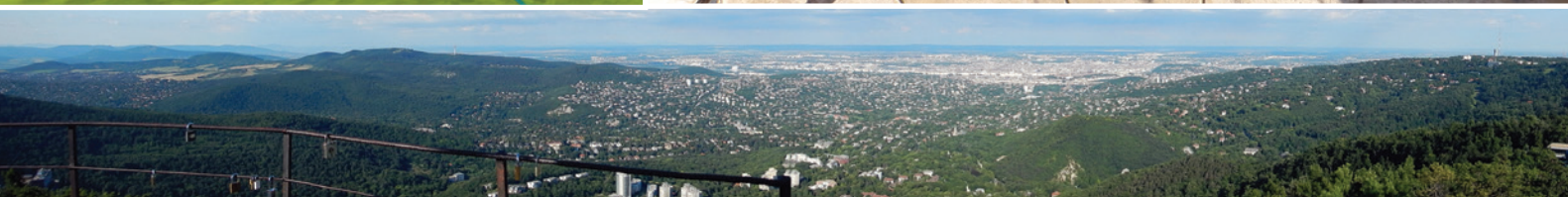
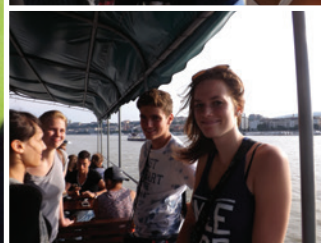
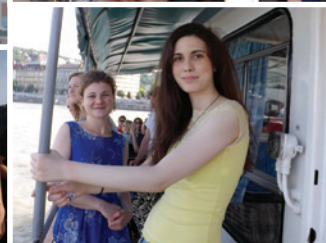
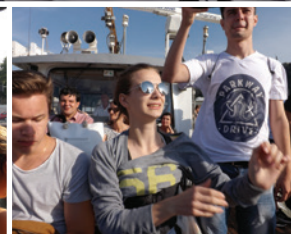
9 HOZZÁJÁRULÁSOK

A kutatótábor létrejöttéhez a következő személyek járultak hozzá:

Dr. Ábrányi-Balogh Péter
Bajusz Dávid
Baksa Attila
Balla Áron
Dr. Barthos Róbert
Bencskó György
Besztercei Balázs
Dr. Bozi János
Deák Róbert
Dr. Demeter Attila
Dobi Zoltán
Fegyverneki Dániel
Dr. Ferenczi-Palkó Roberta
Gajda Gergely
Gonda Imre
Harangozó József
Illés Ádám
Jámbor Andrea
Janzsó Péter
Dr. Jemnitz Katalin
Dr. Keszthelyi Tamás
Kiss Dóra Judit
Dr. Klébert Szilvia
Kránicz Andrea
Dr. Mészáros Gábor
Mezeiné Seres Ágota

Dr. Mihály Judith
Dr. Mohai Miklós
Dr. Nagy Tibor
Nagyházi Márton
Dr. Németh Péter
Dr. Pajkossy Tamás
Dr. Paszternák András
Dr. Paszternák-Szendy Barbara
Pávai Mária
Póti Ádám
Rajnai Eszter
Robotka József
Rosenbergerné Dr. Mihályi Magdolna
Sághy Péter
Dr. Sebestyén Zoltán
Dr. Sebestyénne Petruska Zsuzsanna
Siegl Zoltán
Sóvári Dénes
Spánitz Péter
Sütő Péter
Dr. Szabó Ákos
Dr. Szeltner Zoltán
Dr. Szigyártó Imola Csilla
Vass Ádám
Dr. Wacha András

10 TÁBORI ÉLET



KÉPEKBEN





Magyar Tudományos Akadémia
Természettudományi Kutatóközpont

1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2.
www.ttk.mta.hu/kutatotabor
www.facebook.com/akitabor

