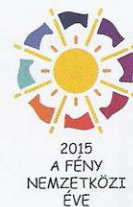


# FLUORESzcENS JELZŐVEGYÜLETEK



Idén immár hetedszer szervezte meg az MTA Természettudományi Kutatóközpont egyhetes AKI Kíváncsi Kémikus kutatótáborát középiskolás diákok számára. A tábor épp a napokban ér véget, a diákok pedig munkájukról dolgozatban számolnak be. A tavalyi táborozók közül Szabó Luca (Budapesti Fazekas Mihály Általános Iskola és Gimnázium) és Bekő Anna (Tamási Áron Gimnázium, Székelyudvarhely, Románia) fluoreszcens jelzőfestékeket állítottak elő – ez pedig idén, a Fény Nemzetközi Évében különösen aktuális téma. Az alábbiakban a diákok beszámolója következik.

**A** Szerves Kémiai Intézet Kémiai Biológia Kutatócsoport laboratóriumában 2014 nyarán részt vettünk egy egyhetes kutatótáborban. Munkánk célja az volt, hogy témavezetőink segítségével minél jobb tulajdonságokkal (megfelelő gerjesztési és kibocsátási hullámhosszal) rendelkező bioortogonális fluoreszcens jelzővegyületeket állítsunk elő, amelyek alkalmasak élő szervezetekben történő vizsgálatokra.

## Biológiai jelentőség

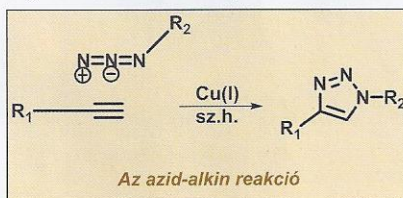
A fluoreszcens festékekkel megjelölt molekulák útja könnyen nyomon követhető a sejteken belül, illetve a sejtek között. Ezeket a jelzővegyületeket egyelőre alap kutatásban alkalmazzák, de esetenként már élő szervezetben is használták őket (elsősorban állatokban). A biomolekulák tudományos szemszögből történő beható tanulmányozása nélkülözhetetlen az élő szervezet bonyolult folyamatainak megértéséhez. A lipidek, szénhidrátok mellett népszerű téma a fehérjék fluoreszcens jelöléssel történő vizsgálata. Használhatják a technikát például receptorok feltérképezésére, de a fehérjék mozgása és konformációváltozásai is megfigyelhetők ezzel a jelölési módszerrel.

A bioortogonális reakció során két adott funkciós csoport csak egymással reagál, gyorsan és stabil termék(ek)et eredményezve. Az így kialakított vegyületek biokompatibilisek, nem toxikusak. E bioortogonális reakciók közül mi az azid-alkin cikloaddícióval foglalkoztunk (a reakció egy három

nitrogénatomot tartalmazó öttagú gyűrűs vegyületet, triazolot eredményez). Ez a reakció teszi lehetővé például a sejtekben bizonyos fehérjék (amelyeken már korábban kialakították a megfelelő funkciós csoportot) fluoreszcens festékekkel való megjelölését.

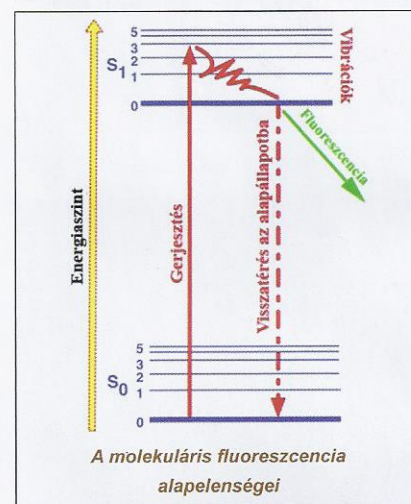
## Gerjesztés és fénykibocsátás

A molekuláris fluoreszcencia során egy gerjesztett állapotú molekula foton bocsát ki (emittál), miközben alapállapotba jut vissza. A gerjesztendő elektron az adott energiaszinteken ( $S_0$  – alapállapot és  $S_1$  – gerjesztett ál-



lapot) különböző rezgési állapotokat vehet fel a molekulák egymással, illetve az oldószer-molekulákkal való ütközéseinek következményeként. Gerjesztéskor az elektron az új pályának kerül, ahhoz, hogy ezt elérje, nagyon rövid idő alatt energiát ad le környezetének (vibrációs relaxáció), az alapállapotba való visszakerülés ezután következik. Emiatt a meghatározott hullámhosszú fényrel megvilágított molekula mindig magasabb hullámhosszú (kisebb energiájú) fényt bocsát ki, tehát eltérő a gerjesztési és az emissziós hullámhossz. A fluoreszcencia detektálása viszonylag olcsó és

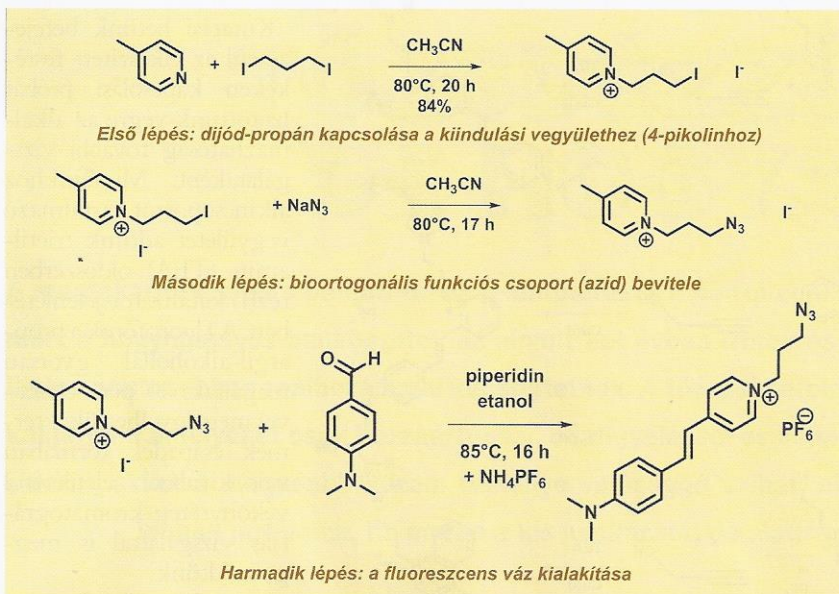
egyszerű is, akár szabad szemmel is észlelhető. Kimutatható nagyon alacsony koncentrációjú oldatban, szélsőséges esetben egyetlen molekula jeladása is észlelhető. Alkalmazása a gyakorlatban kevésbé veszélyes, szem-



ben más, például radioaktív jelölési technikákkal. A jelenség általában konjugált kettős-kötés-rendszerrel rendelkező molekulákra (illetve ionokra) jellemző, jó példák erre bizonyos aromás, illetve konjugált rendszerrel összekötött aromás rendszerek.

## Munka a táborban

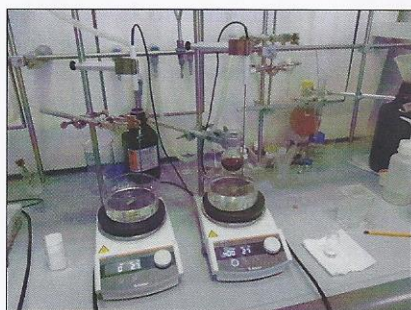
A kutatótábor hete alatt olyan jelzővegyületeket igyekeztünk előállítani, melyeken van bioortogonális funkciós csoport, és emissziójuk minél közelebb esik a vörös színtartományhoz. A vörös fény sejtrészeket roncsoló hatása kisebb, mint az alacsonyabb hullámhosszú fényeké, ugyanakkor mé-



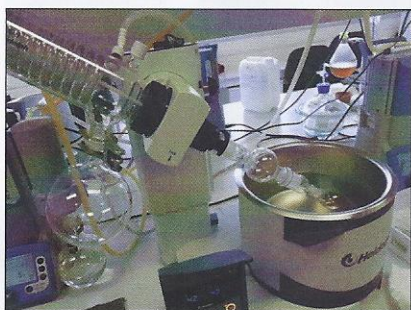
konjugált rész hozzákapcsolhatóságát teszi lehetővé). A kiindulási vegyületeket egy éjszakán át dijód-propán feleslegben (azért feleslegben, hogy minél több kiindulási anyag átalakuljon, és hogy elkerüljük a kettős alkilezést a dijód-propán két végén) forraltuk acetonitril oldószerben. A reakció végén az oldószert bepárooltuk, és kevés etil-acetát hozzáadása után a kiváló sókat (a termékeket) le tudtuk szűrni, mivel alig oldódtak a szerves oldószerben. A termékeket átkristályosítással tisztítottuk etanolból. Az átkristályosítás során azt használtuk ki, hogy ezek a sók forró etanolban feloldódnak, hidegben azonban gyakorlatilag nem. Ezután következett a sók szárítása vákuumban tömegállandósáig.

Második lépésként a köztes termékeinkbe bevittük a bioortogonális funkció csoportot. Esetünkben ez azidcsoportot jelentett. Az első lépésben kapott pikolinium és lepidínium sókat egy éjszakán át forraltuk főlegben alkalmazott  $\text{NaN}_3$  jelenlétében, így megtörtént a jód-azid csere. A reakció során kivált  $\text{NaI}$ -t szűréssel távolítottuk el. Az oldószert elpárologtatása után a nyersterméket feloldottuk diklor-metánban, és ismételten leszűrtük, hogy a  $\text{NaN}_3$  feleslegtől is megszabaduljunk. Ezt követően rotációs vákuumbepárló segítségével elhajtottuk az oldószert, melynek eredményeként barnás, narancssárgás anyagokat kaptunk.

Az utolsó lépés a fluoreszcens váz kialakítása volt. A pozitív töltésű nitrogének miatt a pikolinium és lepidínium sók metilcsoportjai savas



Mágneses keverők, amelyek biztosítják az állandó kevertetést és hőmérsékletet a reakció lejátszódásának ideje alatt



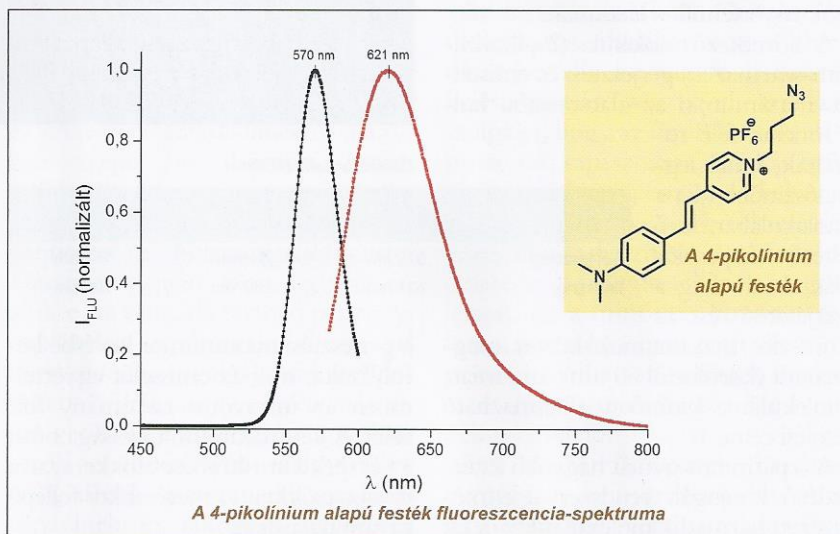
Rotációs vákuumbepárló



Oszlopkromatográfia közben (lényege: a különböző anyagok eltérő ideig kötődnek az oszloptöltettséghez, így eltérő sorrendben távoznak az oszlopról)

lyebbre képes hatolni egy adott szövetben, ezért vastagabb rétegek vizsgálatára jobban alkalmazható. Az emissziós tulajdonságokat az adott molekulán található funkció csoportok elhelyezkedése, és az aromás rész nagysága befolyásolja, kísérleteink e tulajdonságok felderítésével foglalkoztak. Három alapvegyülettel dolgoztunk: a 4-pikolinnal, a 2-pikolinnal és a 4-lepidinnel (a 4-pikolin szerkezetébe egy új aromás gyűrű épül be). Ezekből a kiindulási anyagokból azonos lépéseket végrehajtva, három eltérő spektrális tulajdonságú bioortogonalizált fluoreszcens jelzővegyülethez jutottunk.

Első lépésként a kiindulási vegyületeken (4-pikolin, 2-pikolin, 4-lepidin) a nitrogének pozitív töltést alakítottunk ki (ez egy későbbi lépésben a



tulajdonságúak, megfelelő bázissal, pl. piperidinnel könnyen deprotonálódnak. A keletkező negatív töltésű szénatomok aldehidekkel kézségesen reagálnak. Az alkalmazott reakciókörülmények miatt esetünkben az aldehiddel történő reakciót vízkilépés követte, melynek következtében kettőskötés alakult ki, így létrehozva a konjugált rendszereket. A termékek tisztítását oszlopkromatográfiával valósítottuk meg. A folyamat során a jodid ellenionokat lecseréltük hexafluoro-foszfátionokra, mert ezek az élő sejt számára inerteek.

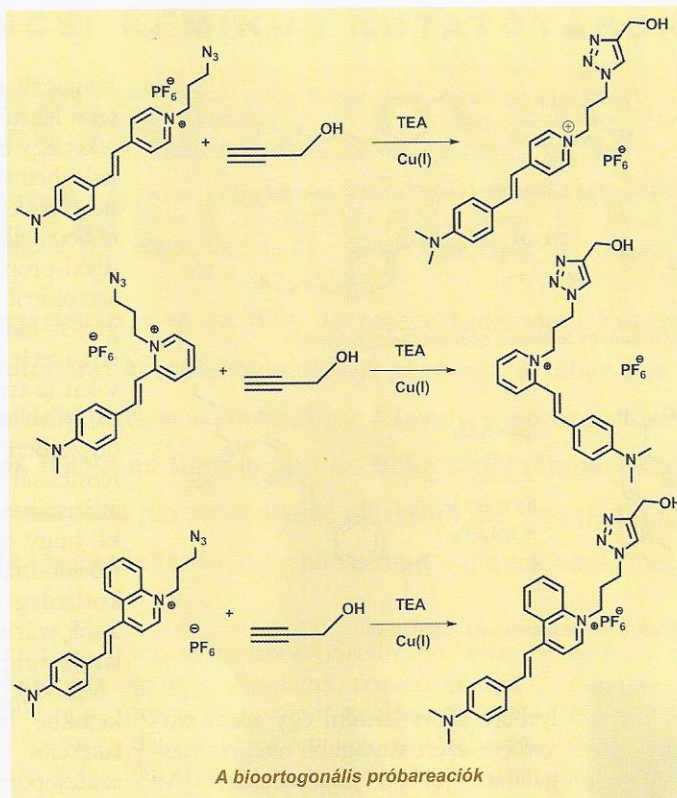
A tiszta festékek fluoreszcens tulajdonságainak vizsgálatához spektrofлуорiméter segítségével felvettük a minták gerjesztési és emissziós spektrumait.

### Az eredmények

Várakozásainknak megfelelően a 4-pikolinium alapú festék a vörös színtartományban emittált, 621 nm-es maximummal 570 nm-es gerjesztési maximummal. A gerjesztési és emissziós maximum közötti 51 nm-es különbségnek köszönhetően pedig jól elkülöníthető a gerjesztő és az emittált fény. Mikroszkóp alatti vizsgálatokat is lehetővé tesz, mert egy megfelelő szűrővel a gerjesztő fény elfedhető, és az emittált, eltérő hullámhosszú fotonok egyértelműen látszanak.

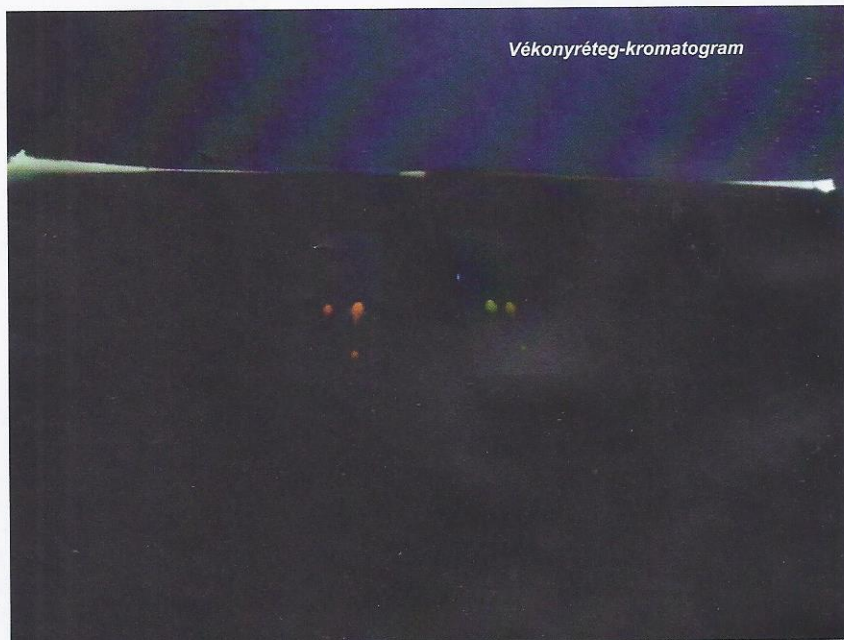
A következő molekula (2-pikolinium-származék) gerjesztési és emissziós maximumai az alacsonyabb hullámhossz felé tolódtak, ennek legvalószínűbb oka a molekulában lévő eltérő kapcsolódás. A távolság a gerjesztési és az emissziós maximumok között megmaradt (körülbelül 60 nm), ami miatt molekulánk kitűnően alkalmazható jelölési célra.

A lepidinium gyűrű nagyobb kiterjedésű konjugált rendszert eredményezett harmadik molekulánkban. Ez



Kutatási hetünk befejezéséül az elkészített festékeken kapcsolási próbat hajtottunk végre az alkalmazhatóság további vizsgálataként. Mintáinkhoz alkincsoportot tartalmazó vegyületet adtunk trietilamin (TEA) oldószerben réz(I) katalizátor jelenlétében. A fluorofórok a propargil-alkohollal gyorsan reagáltak, 10 perc elteltével megfigyelhettük a termék csapadék formában való kiválását, jelenlétéről vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálattal is meggyőződöttünk.

A pozitív töltésű nitrogén helyzete leginkább a konjugációs út változtatása miatt befolyásolta a fluoreszcenciát. Két esetben



Összefoglaló táblázat

Gerjesztés	570 nm	540 nm	562 nm
Emisszió	621 nm	597 nm	706 nm

a gerjesztési maximumot kevésbé befolyásolta, míg az emissziót egyértelműen az infravörös tartomány felé tolt. A két maximum távolsága nőtt, a két spektrum átfedése csökkent, ami tovább csökkenti a mérésekkel fellépő zavaró hatásokat.

alkalmazható, de kevésbé előnyös terméket kaptunk. A 4-lepidinium-származék esetében a nagyobb aromás gyűrű a spektrumot célkitűzésünknek megfelelően a vörös tartomány felé tolt. A kutatótábor hete alatt tehát sikeresen állítottunk elő olyan termékeket, amelyek alkalmasak megfelelően előkészített biomolekulák fluoreszcens megjelenésére.

**SZABÓ LUCA  
BEKŐ ANNA**