

—— Tudományos Diákköri Dolgozat ——

SEBŐ ANNA

Nem természetes luciferin származékok szintézise

Témavezető: Dr. Kele Péter
MTA-TTK, Szerves Kémiai Intézet



—— Eötvös Loránd Tudományegyetem ——
—— Természettudományi Kar ——

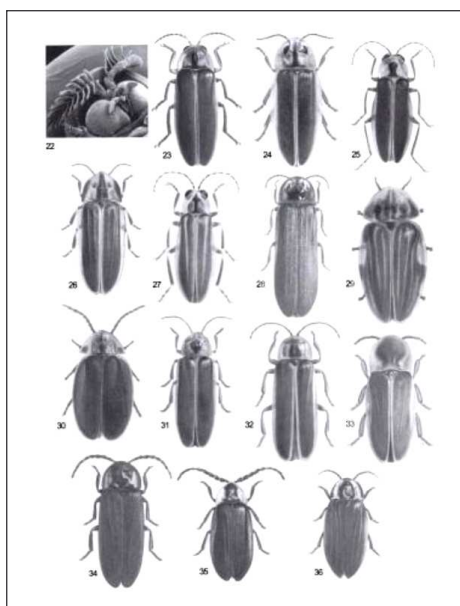
— Budapest, 2014 —

Tartalomjegyzék

1. Bevezető	3
2. Elméleti bevezetés.....	5
2.1. Biolumineszcencia	5
2.2. Luciferin-luciferáz	6
2.3. Luciferinszármazékok	9
3. Célkitűzések.....	10
4. Saját eredmények.....	11
4.1 Rövidítések.....	11
4.2. Szintézisek	12
4.3. Fluoreszcens vizsgálatok.....	14
4.4 Biolumineszcens vizsgálatok	16
5. Kísérleti rész	22
5.1. Általános rész.....	22
5.2. Vegyületek szintézise.....	22
6. Összefoglalás, távlati tervek.....	26
7. Köszönetnyilvánítás.....	27
8. Irodalomjegyzék.....	28

1. Bevezető

Az élőlényekben biokémiai reakció hatására történő fénykibocsátást biolumineszcenciának nevezzük. A természetben ez a jelenség több élőhelyen és több rendszertani csoportban is előfordul. Találunk világító fajokat a tengeri halak, medúzák, eukarióta egysejtűek, baktériumok, de a szárazföldi gombák vagy a rovarok körében is. Ebbe az utóbbi csoportba tartoznak a mindenki által ismert és tudományosan (kémiajukat és zoológiájukat tekintve is) sokat kutatott szentjánosbogár-félék családja (*Lampyridae*) [1] (1



1. ábra Észak-Amerikai *Lampyridae* fajok

ábra).

A biolumineszcencia jelenségének alapja minden esetben egy olyan biokémiai folyamat, amely során a gyújtónevükön luciferineknek nevezett vegyületek katalitikus oxidációja következik be. A folyamatot katalizáló enzimeket nevezik luciferázoknak.

Munkám során célom az volt, hogy ezekhez a természetben is előforduló luciferinekhez hasonló mesterséges származékokat állítsak elő. A szintetizált termék natív vegyülettől

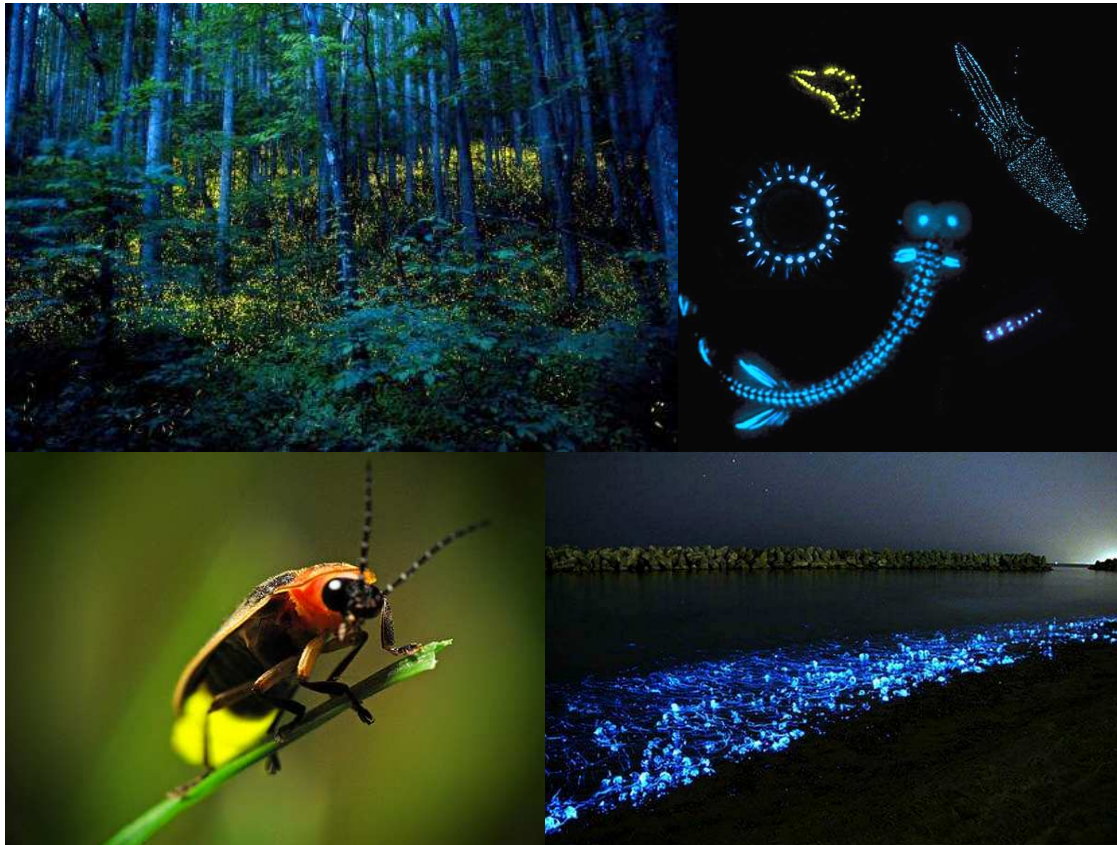
való eltérésének az szab határt, hogy a felhasználhatóság miatt fontos követelmény, hogy az előállított vegyület a természetes luciferáz enzimnek szubsztrátja legyen.

Kémiaiailag az eddig leggyakrabban tanulmányozott rendszer egy észak-amerikai szentjánosbogár faj, a közönséges északi szentjánosbogár (*Photinus pyralis* L. 1767.) luciferin-luciferáz rendszere. Munkám során olyan luciferin szintézisét kívánom megoldani, amely ennek a fajnak a luciferáz enzimjével aktiválható. Munkám újszerűsége, hogy az irodalomban eddig közölt származékok nagy része a természetes luciferin biolumineszcenciájának a vörös tartomány felé történő eltolódását eredményezték.

Általában véve a luciferinek, így az általam előállított vegyületeknek is az ad nagy molekuláris biológiai jelentőséget, hogy az ily módon történő fluoreszcens jelölésnek számos előnye van, a fénnel való gerjesztésen alapuló, fluoreszcens módszerrel szemben. Mivel a biolumineszcencia során nincs szükség külső fényforrásra a gerjesztéshez, minimálisra csökken az élő szervezetekben fellelhető fluoreszcens vegyületek gerjesztése

(autofluoreszcencia), így kiváló jel-zaj arány érhető el. A külső fényforrás hiányából adódóan továbbá a fotodegradációs folyamatok („photobleaching”) is hátrébe szorulnak.

Munkám során négy biolumineszcens vegyület előállítása és vizsgálata volt a cél.



2. ábra Biolumineszcens jelenségek a természetben

2. Elméleti bevezetés

2.1. Biolumineszcencia

A lumineszcenciát csoportosíthatjuk a gerjesztési energia szerint. A leggyakoribb fajtái a fotolumineszcencia, a kemilumineszcencia és a biolumineszcencia. A fotolumineszcencia esetén a gerjesztés energiáját fény biztosítja, a kemilumineszcencia esetén pedig kémia reakció során keletkezik fény.

A biolumineszcencia olyan jelenség, amely során egy biokémia reakció lejátszódása közben a felszabaduló energia nagy része, nem hő, hanem fény formájában kerül kisugárzásra. A jelenség során a luciferin oxidációja történik és eközben gerjesztett állapotú molekula keletkezik. Ez képes fényt kibocsátani, miközben alapállapotú terméket kapunk.

A biolumineszcencia jelenségét már az ókor óta megfigyelték és tanulmányozták. Az ókori Görögországból fennmaradtak feljegyzések a jelenség megfigyeléséről. Már Arisztotelész is felismerte, hogy az így keletkező fény eltérő az égési folyamatokban keletkezőktől, mert úgynevezett „hideg fény”. A biolumineszcencia jelentősége az élővilágban igen sokféle: találunk fajokat, amelyek táplálékszerzésre (pl. mélytengeri horgászhalak), a ragadozó megzavarására (pl. egyes rákfajok biolumineszcens festéket bocsátanak a vízbe, amely megzavarja a támadót) vagy rejtőzködésre (egy halak hasoldala ezüstösen csillog, így az alulról támadó ragadozó számára a hal beleolvad a felülről jövő fénybe) használják a fénykibocsátást. A legismertebb példa talán mégis az, amely a szentjánosbogár-félék családjában fordul elő, ezeknél a fajoknál a párok egymásra találását teszi lehetővé a biolumineszcencia. A szentjánosbogarak esetében azonban nemcsak az imágók, de a lárvák, bábok és peték is bocsátanak ki fényt, de ezek biológiai funkciója kevésbé ismert. A világítás hullámhossza és a felvillanások mintázata fajokra jellemző. [2][3]

Raphaël Dubois, francia gyógyszerész, aki 1887-ben tanulmányozta a jelenséget, kísérletei alapján megállapította, hogy a biolumineszcenciához kétféle vegyület szükséges. Az egyik vegyület egy hőstabil szerves vegyület, ami a jelenség során oxidálódik, a másik pedig egy hőre elbomló enzim, amely katalizálja a folyamatot. Ezt úgy mutatta ki, hogy két részre osztotta a *Pholas* kagylóból kivont biolumineszcens anyagot. Az egyik részletben megvárta, hogy lejátszódjon a reakció, a másik részletet pedig forrásig melegítette. Melegítés hatására a fényjelenség megszűnt. Majd ezt az oldatot hozzáadta a hideg oldathoz és újra tapasztalta a lumineszcenciát. A kísérletben eltérő tulajdonságokat mutató vegyületeket lucifeineknek és

luciferázoknak nevezték el. A vegyületek neve a Lucifer szóból származik, aminek a jelentése „fényhozó”. [2]

A kemilumineszcencia a biolumineszcenciához hasonló jelenség, csak ebben az esetben nem biokémiai reakció során keletkezik fény, hanem egy élő szervezetekhez nem köthető kémiai reakció során. Érdekes különbség, hogy amíg a biolumineszcencia esetén a Φ (kvantumhasznosítási tényező: emittált fotonok száma/oxidálódott molekulák száma) az egységnyihez közelít, addig a szokványos kemilumineszcenciás reakciók esetében csak 0,01 körüli. A biolumineszcencia 10-12 perc alatt éri el intenzitásának csúcsát, és kb. egy óra alatt szűnik meg.[4]

A biolumineszcencia jelensége laboratóriumban jól tanulmányozott jelenség. Legfőképpen az amerikai szentjánosbogár luciferin-luciferáz rendszerét vizsgálták igen részletesen. Több olyan vizsgálat is történt, amelyben különböző luciferin szubsztrátokat állítottak elő, hogy a keletkező fény hullámhossza eltérő legyen. Az irodalomban még csak kevés példa található módosított szubsztrátokra. Az eddig megismert módosítások főként csak olyan változtatásokat jelentettek, amelyek azt eredményezték, hogy az eredeti zöld szín helyett vörös felé tolódott el a kisugárzott fény hullámhossza. Ellenkező irányú, a kék tartomány felé történő eltolódásra csak igen kevés példa található a szakirodalomban annak ellenére, hogy többszörös jelölési módszereknél a látható fény spektrumának teljes lefedése lenne kívánatos.

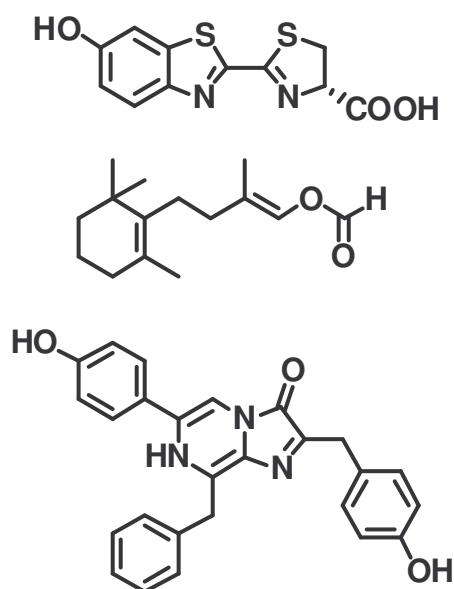
A biolumineszcens festékekkel való festés több dologból is előnyös. Ilyen festékeket a biokémiai gyakorlatban az 1990-es évektől használnak. Alkalmazzák őket például génexpresszió nyomon követésére és ATP mennyiségének meghatározására. Mint azt a bevezetőben is kiemelttem, a biolumineszcencia alkalmazásával olyan festésekre nyílik lehetőség, amelynek esetében a gerjesztő fény hiányából adódóan, autofluoreszcencia és fotodegradáció mentes jelölési eljárás válik lehetővé. [5][6][7]

2.2. Luciferin-luciferáz

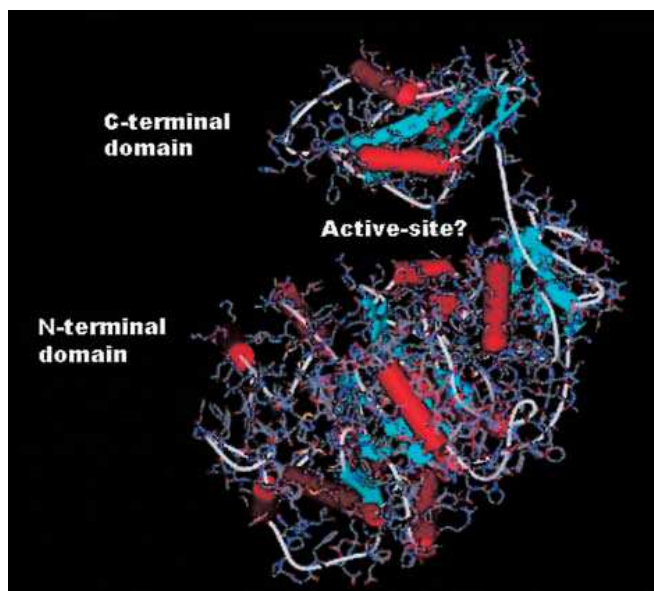
A címben említett enzim-szubsztrát kölcsönhatás következtében lejátszódó oxidáció során bekövetkezett lumineszcens fény hullámhossza 510 és 670 nanométer közötti (zöld – sárga - vörös). [8]

A természetben többféle luciferin és luciferáz enzim előfordul. A laboratóriumban leggyakrabban használt biolumineszcens rendszer az észak-amerikai szentjánosbogár

luciferin-luciferáz reakcióján alapul. A szentjánosbogár luciferin szerkezete a 3. ábrán látható felül, alatta egy csiga és egy medúza luciferin látható. A szentjánosbogár luciferáz enzimének szerkezete a 4. ábrán látható. Az enzimmal nem csak a természetes szubsztrát oxidációja katalizálható, hanem az előállított módosulatoké is.



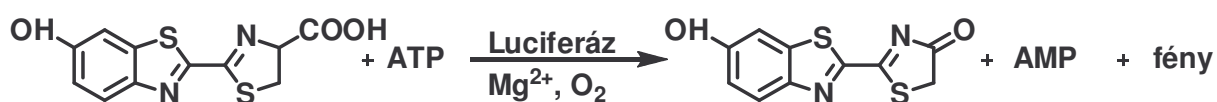
3. ábra Különböző luciferin molekulák szerkezete



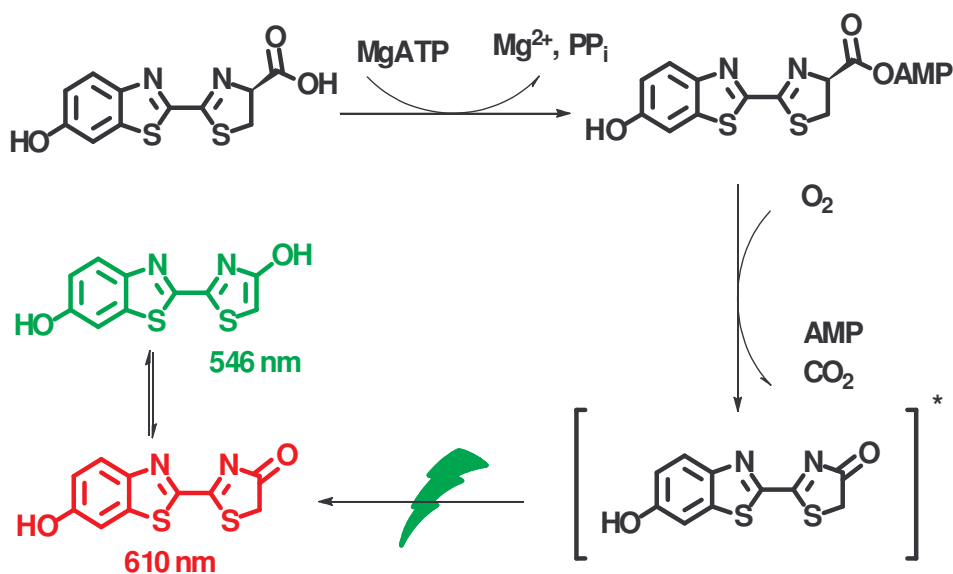
4. ábra A szentjánosbogár luciferáz szerkezete [3]

A luciferinek heterociklusos vegyületek, amelyek segítségével létrejöhet a biolumineszcencia. Az észak-amerikai szentjánosbogár esetén ennek a szerkezete és

oxidációja a 5. ábrán látható. A natív luciferin az (S)-2-(6'-hidroxi-2'-benztiazol)-2-tiazolin-4-karbonsav. A vegyület ATP, Mg^{2+} és megfelelő luciferáz enzim jelenlétében oxoluciferinné oxidálódik a biolumineszcens reakció során. A vegyület a 4-es C atomon található karboxil csoporttal kapcsolódik az enzimhez, ezért ez nélkülözhetetlen a származékok esetében is. Az oxidáció mechanizmusa a 6. ábrán látható. Az oxidációhoz szükséges Mg^{2+} , luciferáz enzim, oxigén és ATP. A természetes luciferin 546-610 nm-en biolumineszkál, körülményektől (pH) függően. Attól függően, hogy az enol vagy az oxo forma a stabilabb. Először a luciferin megkötődik az enzim aktív zsebében, majd adenilálódik és molekuláris oxigénnel reagál, ekkor gerjesztett állapotú oxiluciferin keletkezik. A gerjesztett állapotú oxiluciferin fénykibocsátással kerül vissza alapállapotba [5]



5. ábra A luciferin oxidációja

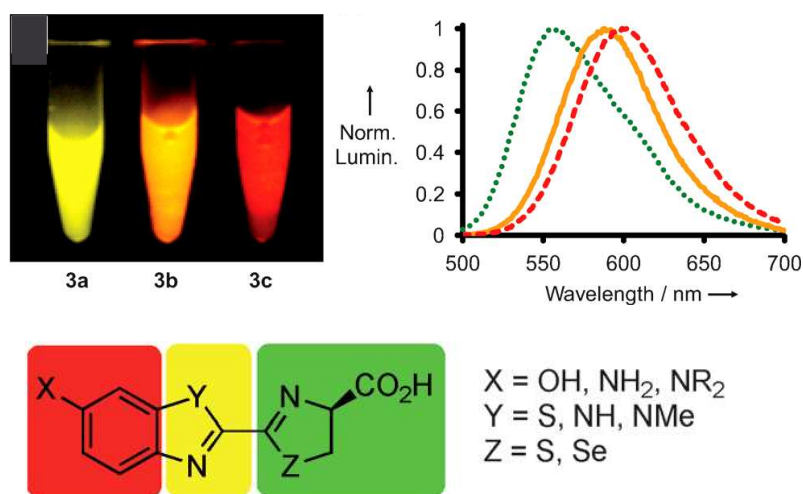


6. ábra A luciferin oxidációjának mechanizmusa

2.3. Luciferinszármazékok

Az általam végzett szintézisek során négyféle luciferin származékot állítottam elő. Ezek az anyagok, mivel kapcsolódni képesek a luciferázzal, megtalálható bennük a karboxil csoport a megfelelő szénatomon, szintén biolumineszcens vegyületek, de eltérő színnel biolumineszkálnak.

A luciferin molekula két fő modulból, egy benzotiazol és egy tiazolin egységből épül fel (5. ábra). Vizsgálatok kimutatták, hogy a luciferáz enzim általi felismeréshez a karboxil-csoport mellett a tiazolin rész elengedhetetlen, így ezt a modult konzervatív, kevésbé variálható egységként kell kezelnünk. A szakirodalomban csak olyan korlátozott módosításokra találunk példát a tiazolin egységre vonatkozóan, ahol a kénatomot szelénnel helyettesítették. E módosítás egyébként a spektrum vörös tartomány felé történő eltolódását eredményezte [9]. A benzotiazol egység egyéb aromás rendszerekkel történő helyettesítésére sokkal több példát találunk.[10][11][12][13][14]

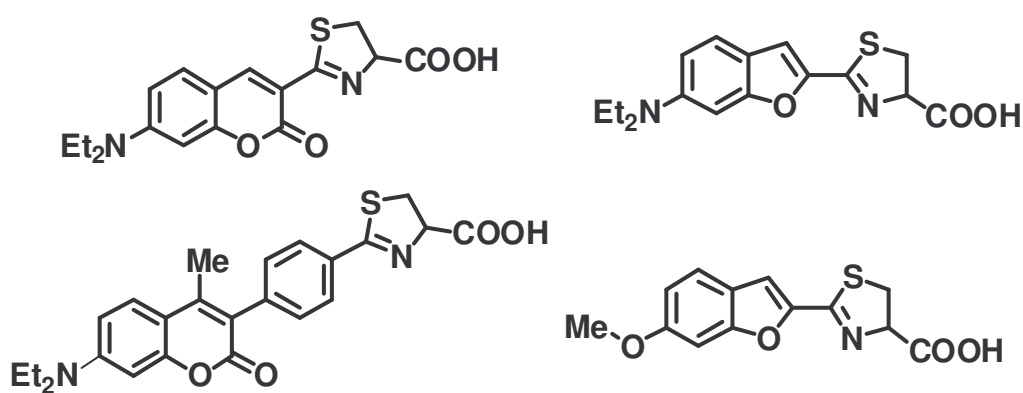


7. ábra Luciferin származékok

3. Célkitűzések

Munkám során négy luciferinszármazékot terveztem előállítani. Ezek a szerkezete a 8. ábrán látható. Olyan vegyületek előállítása volt a cél melyek, a spektrum kék tartományában emittálnak. A célvegyületek szerkezetéből látszik, hogy az eredeti tiazolin egység megtartása mellett a benzotiazol modul kumarinnal, illetve egy fenil-kumarinnal, illetve benzofuránnal történő cseréjét terveztem.

A szintéziseket követően ugyancsak terveztem az előállított vegyületek fluoreszcens és biolumineszcens jellemzését is.



8. ábra Az előállított luciferin analógok szerkezete

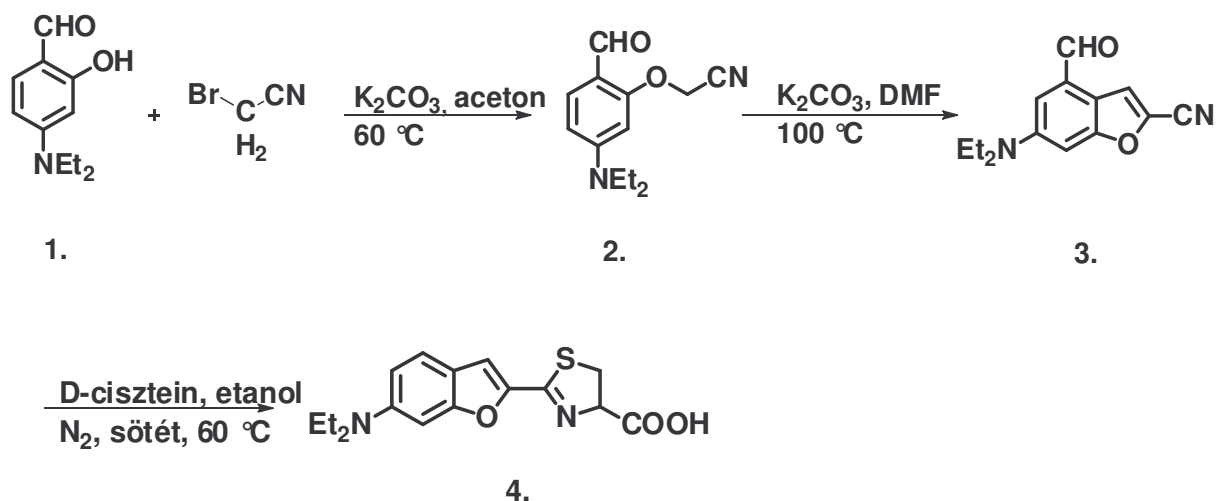
4. Saját eredmények

4.1 Rövidítések

ATP	adenozin-5'-trifoszfát
CoA	koenzim-A
CsF	céziium-fluorid
DCM	diklór-metán
DMF	N,N-dimetil-formamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
Et	etil-csoport
EtOAc	etil-acetát
HPLC	nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia
Me	metil-csoport
VRK	vékonyréteg kromatográfia

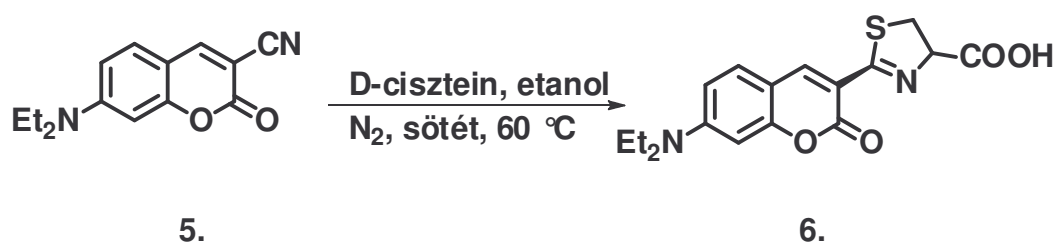
4.2. Szintézisek

Az első luciferinszármazék előállításához először az **1.** vegyületet reagáltattam bróm-acetonitrillel.[15] A keletkező vegyületből (**2.**) gyűrűzárásos reakcióval kaptam meg a **3.** anyagot.[16][17][18] Ezt reagáltattam **D**-ciszteinnel és így kaptam meg az első luciferinszármazékot (**4.**). (9. ábra)[16]



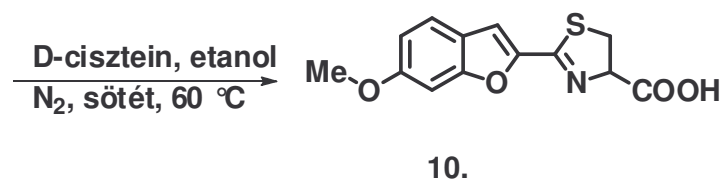
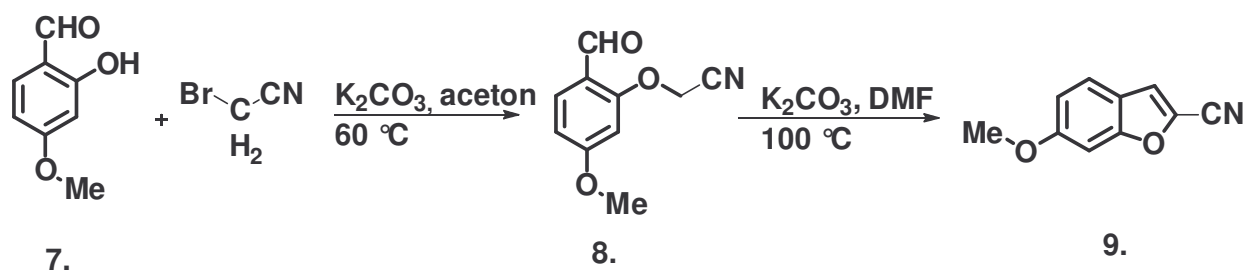
9. ábra A **4.** vegyület szintézise

A második luciferin származék előállításához az **5.** vegyületet reagáltattam **D**-ciszteinnel. (8. ábra) [19]



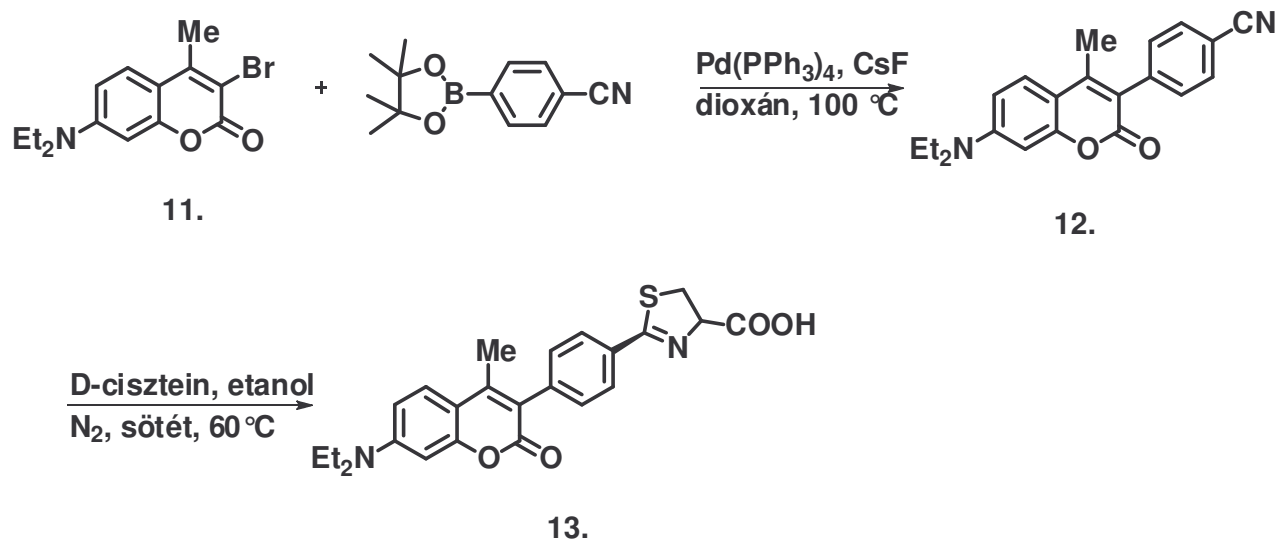
10. ábra a **6.** vegyület szintézise

A harmadik luciferinszármazék előállításához először a **7.** anyagot reagáltattam bróm-acetonitrillel.[15] A keletkező vegyületekből (**8.**) gyűrűzárásos reakcióval kaptam meg a **9.** molekulát. [16][17][18] Ezt reagáltattam **D**-ciszteinnel és így kaptam meg a harmadik luciferin származékot (**10.**). (11. ábra)[16]



11. ábra a **10.** vegyület szintézise

A negyedik luciferinszármazék előállításához először a **11.** anyagot reagáltattam bórsavészterrel $\text{Pd(PPh}_3)_4$ és CsF katalizátor jelenlétében dioxánban. A reakció két óra alatt játszódott le, még a reakció elegy színe sötétre változott. Az így kapott nitrilt reagáltattam D-ciszteinnel és így kaptam meg a negyedik luciferin származékot (**13.**). (12. ábra)



12. ábra a **13.** vegyület szintézise

4.3. Fluoreszcens vizsgálatok

Két célvegyületre elméleti számításokat végeztünk a fluoreszcenciára. Ennek eredménye az első táblázatban található. Mindkét esetben az emisszió a természetes luciferinhez képest a spektrum kék tartományába eltolódott eredményt adta az elméleti számítások alapján.

	4. oxidált származéka	6. oxidált származéka
$\lambda_{\text{exp}} / \text{nm}$	480	449
$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	524	482

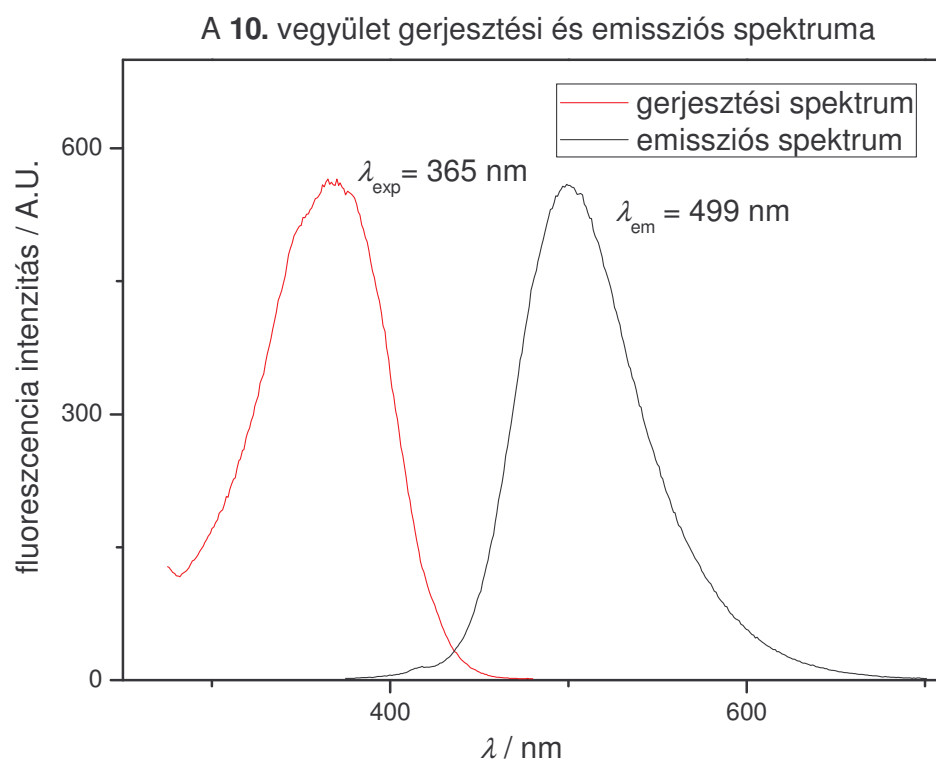
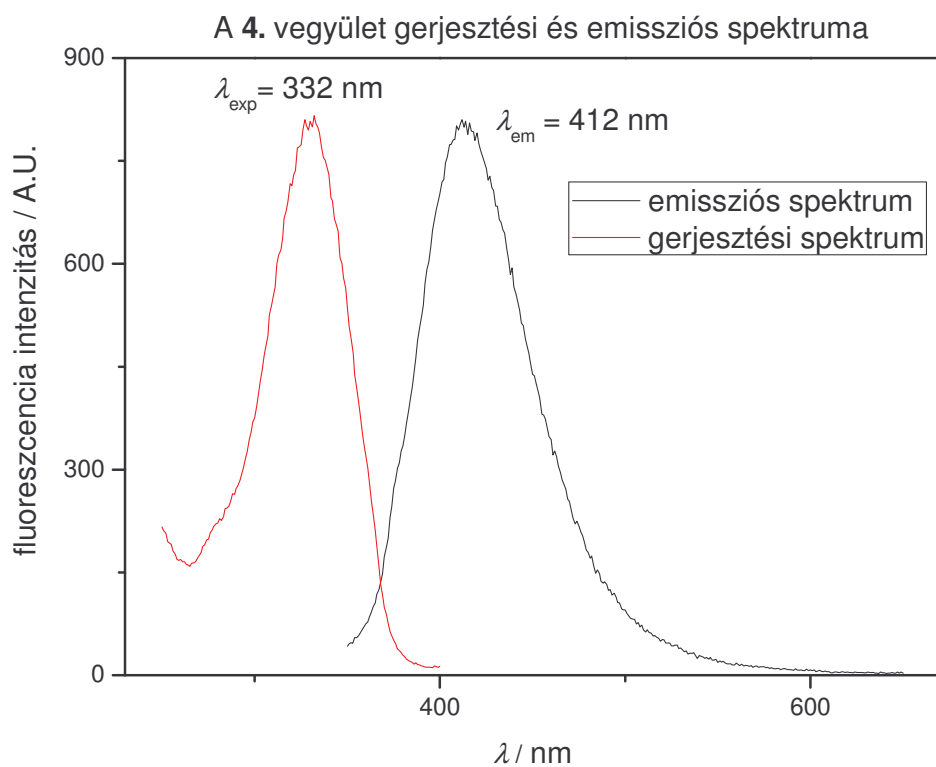
1. táblázat: 4. és 6. anyagok gerjesztési és emissziós maximumai az elméleti számítások alapján (Geometria: DFT szint, PBE0 funkcionál, G-311++G** bázis)

Az előállított vegyületek esetében felvettük a gerjesztési és az emissziós spektrumokat és megállapítottuk a jellemző hullámhosszokat (λ_{exp} és λ_{em}).

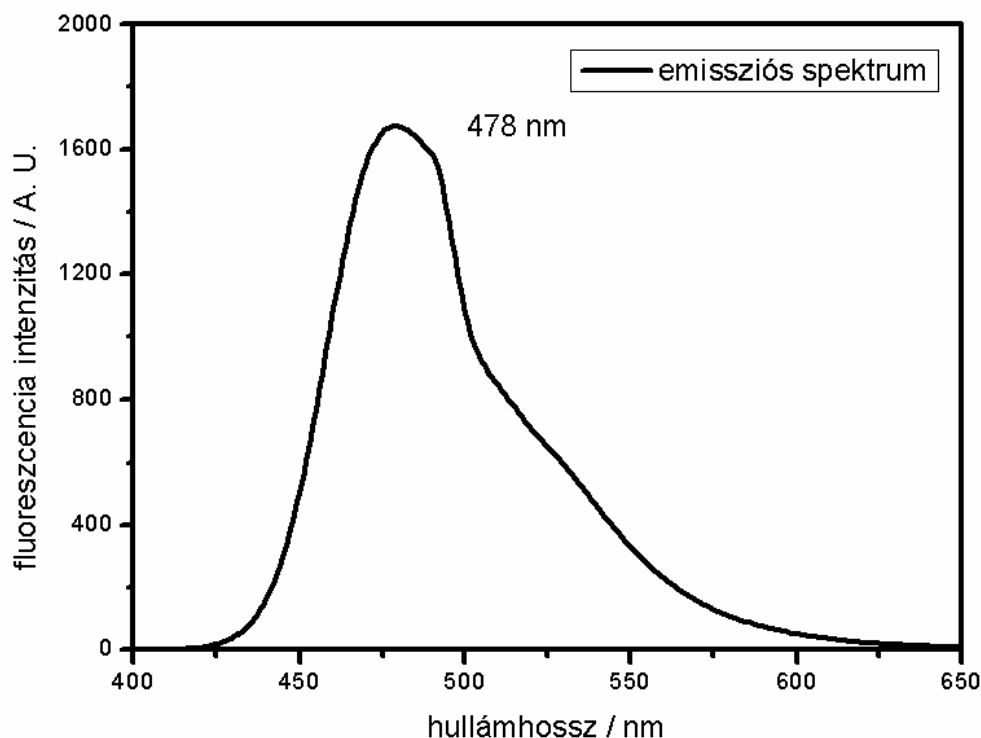
Ezeket a spektrumokat az alapállapotú vegyületekre vettem fel. A három spektrum a 13. ábrán látható. Ennek eredményét foglaltam össze a 2. táblázatban. A **4.** és a **10.** vegyület a két benzofuránvázis származék.

	4.	10.
$\lambda_{\text{exp}} / \text{nm}$	332	365
$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	412	499

2. táblázat: 4. és 10. anyagok gerjesztési és emissziós maximumai



13. ábra: A gerjesztési és emissziós spektrumok, a fluoreszcencia intenzitása a hullámhossz függvényében a **4.** és **10.** vegyület esetében

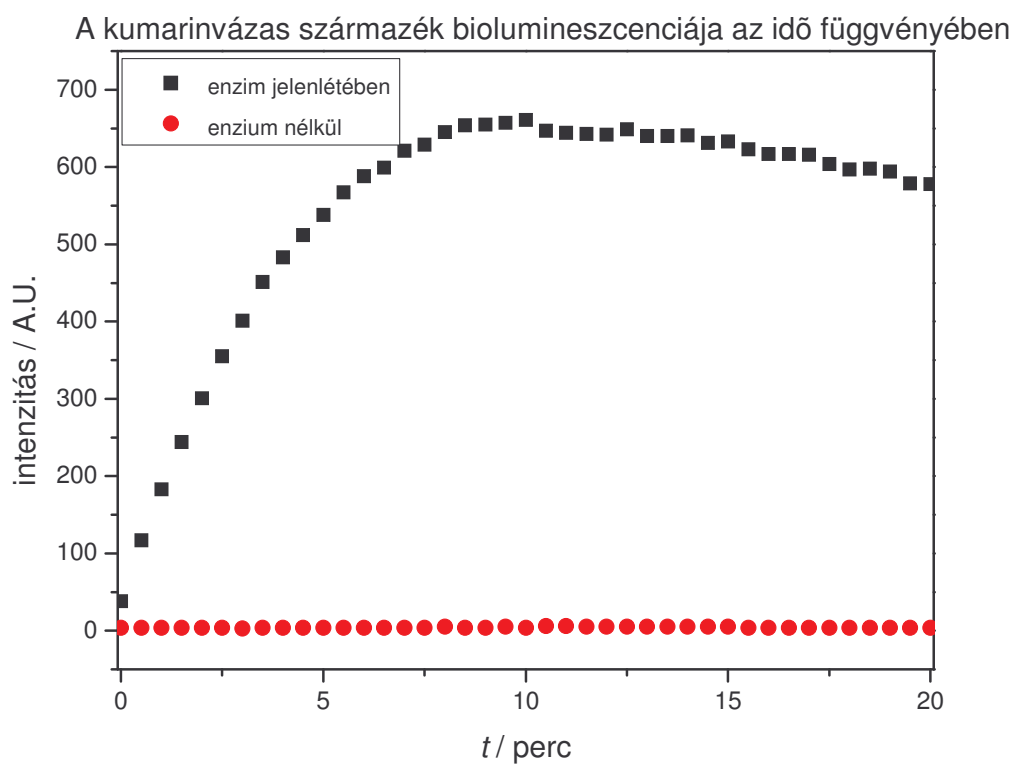


14. ábra: Az emissziós spektrum a 6. vegyület esetében, a fluoreszcencia intenzitása a hullámhossz függvényében

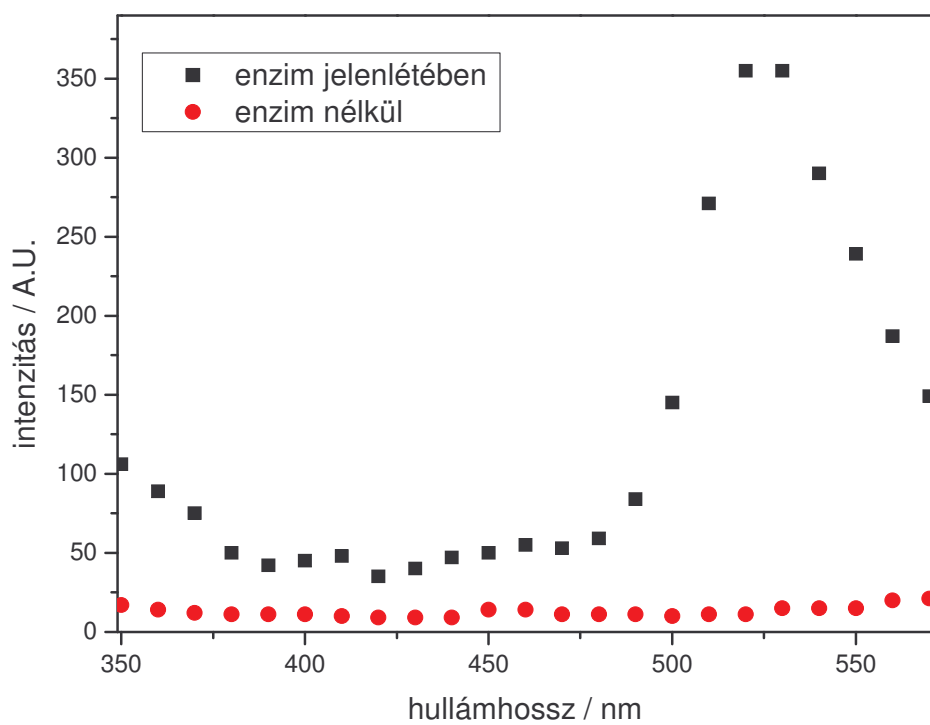
Ezen mérések alapján megállapítható, hogy az előállított vegyületek gerjesztési és emissziós spektruma az eredeti luciferinhez képest a kék tartomány felé tolódott el.

4.4 Biolumineszcens vizsgálatok

Két vegyület esetében (6. és 10.) megvizsgáltam a vegyületek biolumineszcenciáját. A kumarinvázis származék esetén az **D** izomer esetén vizsgáltam meg a biolumineszcenciát. Ehhez 0,2 ml 10 mmol/dm³ -es oldatot készítettem belőle DMSO-ban. Ezt az oldatot hígítottam 50x-re a biolumineszcens vizsgálat során PBS pufferrel, mivel az enzim csak megfelelő közegben, vízben katalizálja a folyamatot. Ehhez Mg²⁺ CoA-t és ATP-t adtam, mivel ez szükséges a biolumineszcencia létrejöttéhez. Az oldatot két részre vettem az egyiket vakmintaként használtam a másikhoz pedig luciferáz enzimet adtam. Időben vizsgáltam a biolumineszcenciát ennek eredménye a 14 ábrán található. Ennek alapján először megállapítható, hogy a szintetizált származék valóban szubsztrátja a luciferáz enzimnek. A biolumineszcencia először gyengébb intenzitással indul, a maximumát kb. 5 perc után éri el. Ezek után lassan csökkenő intenzitással 15 percig vizsgáltam a vegyületet.



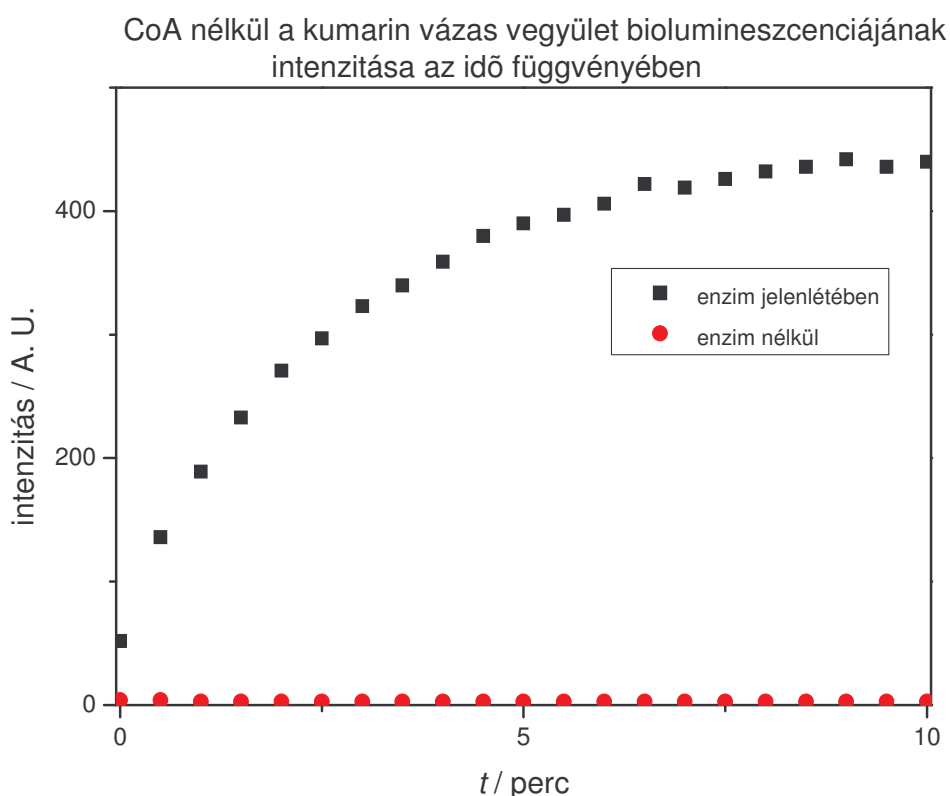
15. ábra A biolumineszcencia a 6-os vegyület esetében



16. ábra A biolumineszcencia a 6-os vegyület esetében 2.

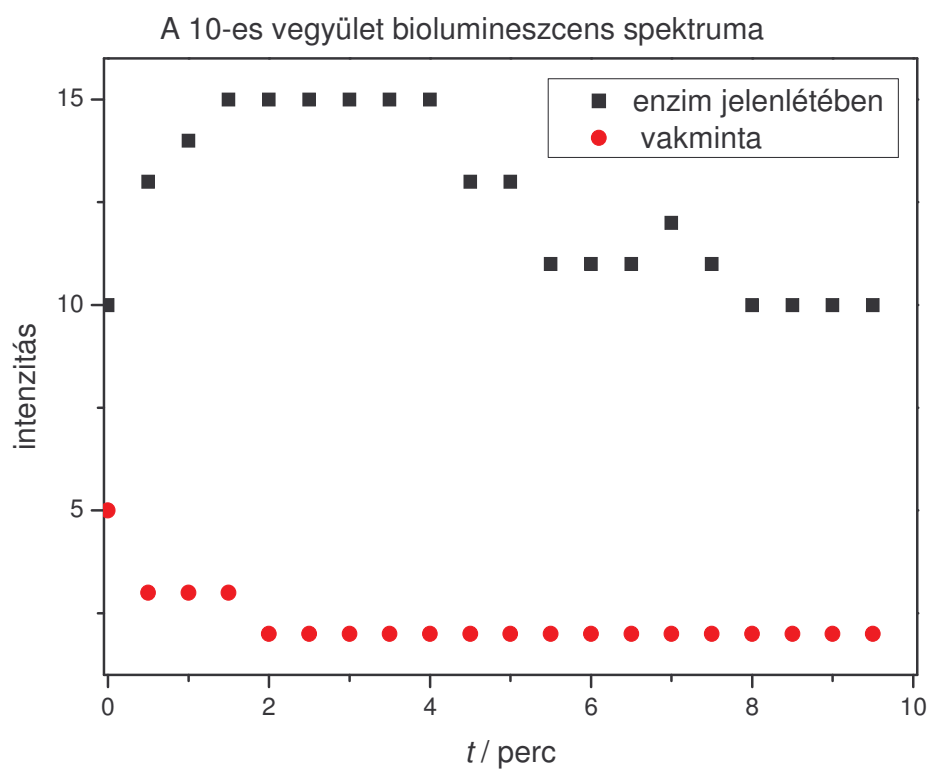
Meghatároztam a biolumineszcencia hullámhosszát is. A 16. grafikon alapján megállapítható, hogy a vegyület esetében 530 nm körül van a biolumineszcens fény hullámhossza a kumarinvázis vegyület esetében. A biolumineszcencia kinetikájának mérése során is ezen a hullámhosszon történt a mérés.

A **D**-származék esetén CoA nélkül is észlelhető a biolumineszcencia. Ezért az előzőhöz hasonlóan CoA nélkül is elvégeztem a mérést. CoA abban az esetben mindenképpen szükséges, ha **L**-származékot is tartalmaz az előállított minta. CoA hatására az **L**-származék lassan **D**-származékká izomerizálódik át, amivel már vizsgálható a biolumineszcencia. Ennek eredménye a 17. ábrán látható. Itt hasonló eredményt kaptam, mint az előző esetben, vagyis kezdetben nőtt a kibocsátott fény intenzitása majd a továbbiakban még kb. 5 percig vizsgáltam a biolumineszcencia intenzitását. Megállapítható ez alapján, hogy valóban a **D**-származékot állítottam elő és ez bekötődik az enzim aktív zsebéhez és a luciferinhez hasonló körülmények között oxidálódik

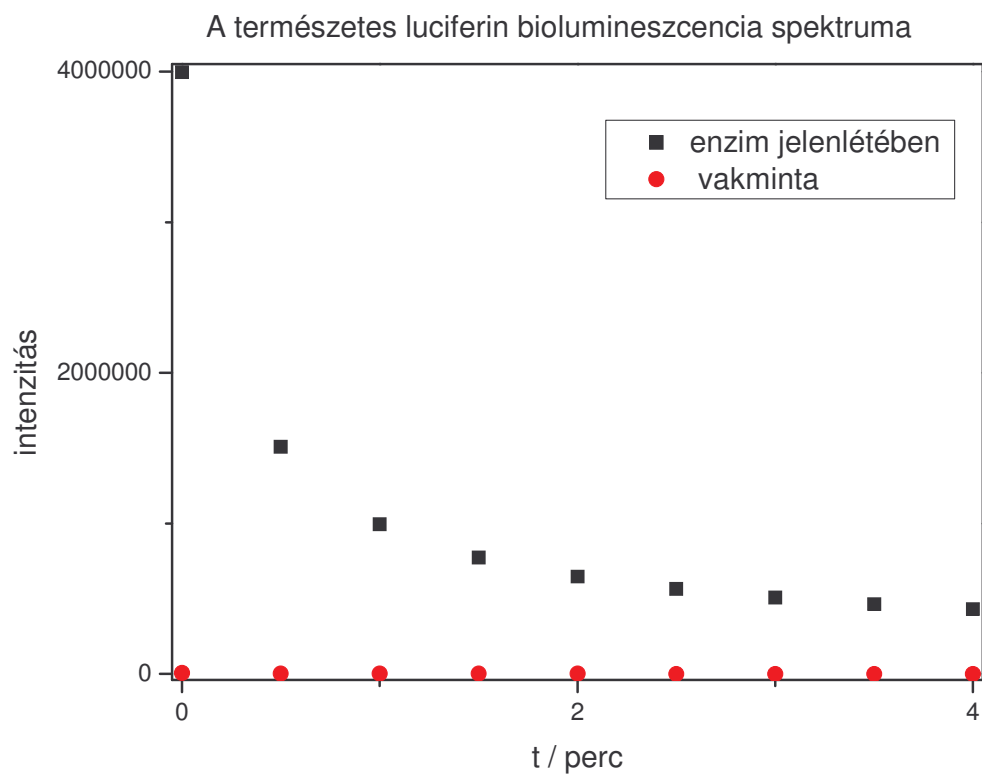


17. ábra A biolumineszcencia a 6-os vegyület esetében 2.

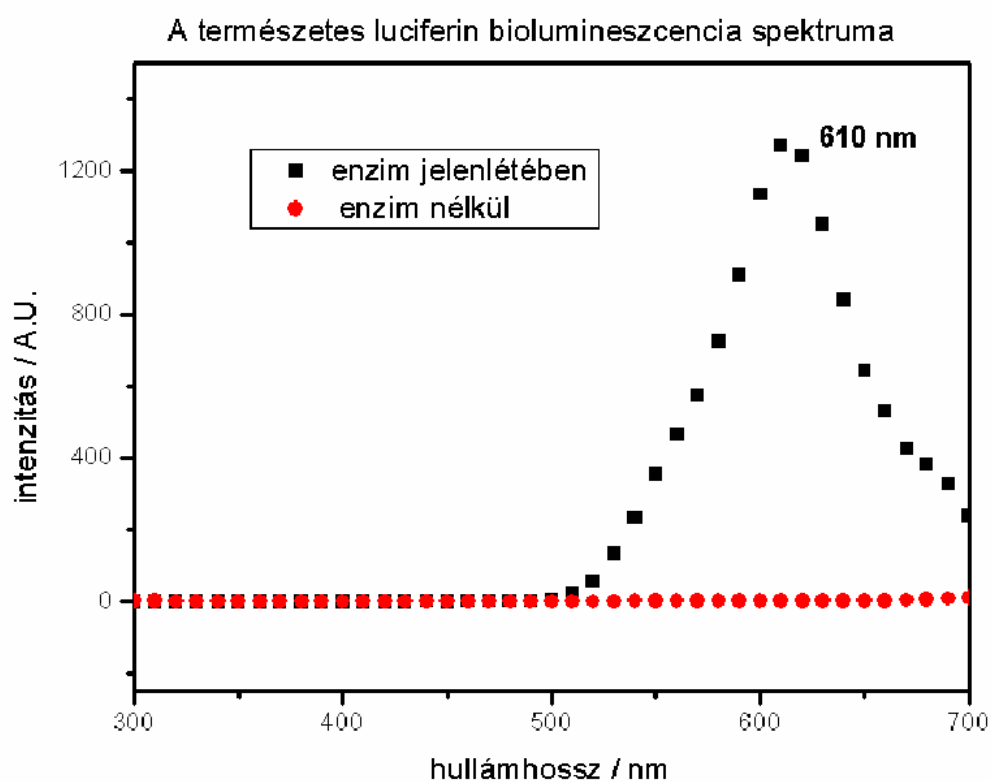
A metoxi-csoportot tartalmazó benzofuránvázás vegyület esetében (10. vegyület) az L származékot tudtam vizsgálni. Itt is az előzőekhez hasonlóan jártam el. Ebben az esetben mivel az L-származékot vizsgáltam, ezért CoA-ra mindeképpen szükség van. Látható a 18. ábra alapján, hogy kisebb az intenzitás, ennek oka, hogy az L vegyület csak lassan izomerizálódik át CoA hatására D vegyületté.



18. ábra A biolumineszcencia a 10-os vegyület esetében 2.



19. ábra. Biolumineszcencia a natív luciferin esetében



20. ábra A biolumineszcencia a natív luciferin esetében

Felvettem a természetes luciferin biolumineszcencia spektrumát is. Ennek eredménye a 20. ábrán látható. Ezek alapján megállapítható, hogy a luciferin jobb szubsztrátja a luciferáz enzimnek, mint a mesterséges származékok, mivel sokkal nagyobb intenzitású a kibocsátott fény a luciferin esetében. A **D** – származék esetén CoA jelenléte nélkül is tapasztalható a biolumineszcencia. Az **L** – származék esetén is tapasztalható a biolumineszcencia CoA jelenlétében, de ebben az esetben ez kisebb intenzitású. Felvettem, hogy ezen körülmények között a luciferin milyen hullámhosszú fénnel biolumineszkál, az ábráról leolvasható, hogy ez 610 nm. Tehát az előállított kumarinvázis vegyület a natív luciferinhez képest kékebb színű fényt bocsát ki.

5. Kísérleti rész

5.1. Általános rész

A reakció során a Sigma-Aldrich és Fluka vegyszereit használtam külön tisztítás nélkül. A **6.** vegyület előállításához használt **5.** anyagot Cserép Gergely szintetizálta. A VRK vizsgálatokhoz Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ lapot használtam, az oszlopkromatográfiához (0,040-0,063 mm-) szilika gél a Merck-től.

A ¹H NMR méréseket Bruker DRX-250 spektrométeren végeztem. A kémiai eltolódásokat (δ) ppm-ben az oldószerhez viszonyítva, a csatolási állandót (J) Hz-ben adtam meg. A jelfelhasadások esetében a használt rövidítések: s (szinglett), d (dublett), t (triplett), q (kvintett) és m (multiplett). A spektrofotometriás méréseket egy Varia Eclipses spektrofluoriméteren végeztem.

5.2. Vegyületek szintézise

A **2.** vegyület előállításához 0,484 g (2,5 mmol) **1.** anyagot refluxáltattam 0,360 g (3,0 mmol) bróm-acetonitrillel 4,5 ml acetonban 4 órán át 0,485 g K₂CO₃ jelenlétében. A reakció lejátszódását VKR-val követtem. A kapott oldathoz 10 ml EtOAc-t és 10 ml NaHCO₃ oldatot adtam, majd rázótölcsérrel elválasztottam a fázisokat. A vizes fázist 3x 3ml EtOAc-al mostam, majd a szerves fázisokat egyesítettem és 10 ml NaCl-el mostam. A termék a szerves fázisban volt. A kapott terméket VRK-n hexán-EtOAc (5:1, 1:1) és DCM-metanol (30:1) elegyekkel vizsgáltam. Az R_f értékekből megállapítottam, hogy az oszlopkromatográfiás tisztításhoz a legalkalmasabb a hexán-EtOAc elegy. Ebben az esetben a termék R_f értéke 0,48, a kiindulási anyagé R_f 0,84. Az elegyet szilika gélen hexán-EtOAc 1:1 arányú elegyével tisztítottam, majd a megfelelő frakciókat egyesítettem. Az oldószert rotációs vákuumbepárlón elhajtottam. Ekkor 0,409 g piszkosfehér anyagot kaptam. (70,3%-os kitermelés). A reakciót később újra megismételtem, ekkor szintén 2,5 mmol **1.**-ből 3,0 mmol bróm-acetonitrillel, a már leírtak szerint dolgoztam fel a terméket. Ez esetben 0,285 g anyagot kaptam (57 %-os kitermelés). ¹H NMR: δ 10,04 (s, 1H), 7,72 (d, J = 9, 1H), 6,41 (dd, J = 2,2 J = 8,9, 1H), 6,15

(d, $J = 2,2$ 1H), 4,88 (s, 2H), 3,45 (q, $J = 7,2$ 4H); 1,25 (t, $J = 7,2$ 6H); ^{13}C NMR: 186,7; 161,0; 154,0; 132,4; 115,3; 114,9; 106,7; 95,3; 54,5; 45,4; 12,9.

A **3.** vegyülethez 0,409 g (1,7 mmol) **2**-t és 0,337 g (2,4 mmol) K_2CO_3 -at reagáltattam 2 órán keresztül 17 ml DMF-ben 100 °C-on. A reakciót VRK-val követtem hexán-EtOAc 1:1 elegyet használva eluensként. A termékről az oldószert eltávolítottam és hexán-EtOAc eluenst használva szilikagélen tisztítottam. Ekkor 0,200 g sárgászöld olajos terméket kaptam (53%-os kitermelés). A reakciót később megismételtem, ekkor 0,285 g **2**-ből és 0,235 g K_2CO_3 -ből indultam ki. A tisztítás az előzőekhez hasonlóan végeztem és 0,151 g terméket kaptam (57%-os kitermelés). ^1H NMR: δ 7,38 (d, $J = 9$ 1H), 7,26 (s, 1H), 6,76 (dd, $J = 2,2$ $J = 8,9$, 1H), 6,64 (s, 1H), 3,40 (q, $J = 7,1$ 4H); 1,21 (t, $J = 7,1$ 6H); ^{13}C NMR: 159,1; 149,7; 124,3; 123,3; 119,5; 114,7; 113,5; 111,6; 93,1; 45,5; 12,3

A **4.** vegyület előállításához 24,2 mg (0,098 mmol) **3.** reagáltattam 49,45 mg (0,28 mmol) D-cisztein hidrokloriddal 24 órán keresztül 60 °C-on nitrogén atmoszférában sötétben. A **3.** -t 40 ml etanolban oldottam, majd hozzáadtam argon atmoszférában a D-cisztein vizes oldatát (5 ml vízben oldva) 0,5 M-os K_2CO_3 -al pH = 8-ra beállítva. A termékünk nem futtatható jól VRK-n csak nBu:jégecet:víz 4:1:1 arányú elegyében, a termék ebben az esetben a kék színnel fluoreszkáló folt lett. A feldolgozás során a kapott terméket berotáltam és 40 ml metanolt adtam hozzá, majd a feloldatlan sót vákuumon leszűrtem. A szűrletet berotáltam és 5 ml vizet adtam hozzá, amit 0,1 M-os HCl-el pH=4-ig savanyítottam, ekkor a sárga oldatból narancssárga csapadék vált ki, amit leszűrtem és szűrőről metanollal mostam, majd berotáltam. A kapott nyerstermék tömege kb. 50 mg volt. A nyersterméket HPLC-vel tisztítottam, a termék csúcsát MS alapján sikerült beazonosítani. A HPLC-vel való tisztítás során víz (TFA 0,1%) (A eluens) és 80 % acetonitril 20% víz (TFA 0,1%) (B eluens) keveréke volt az eluens minden esetben. A tisztítás után 18 mg narancssárga szilárd anyagot kaptam. A tisztított termékkel elvégeztem a biolumineszcens vizsgálatokat. A termék máféléképpen is tisztítható, egy másik esetben hasonló mennyiségekkel dolgozva termék feléhez 20 ml vizet és 1 ml 2 M-os NaOH-oldatot adtam és az elegyet 2x50 ml EtOAc-al kiráztam, a vizes fázist savval semlegesítettem kb. pH=5-6-ra és az így kapott elegyet ismét 3x 50 ml EtOAc-al extraháltam. Ezt a termék másik felével is megismételtem. Az így kapott anyagot DCM:metanol 9:1 arányú elegyében futtattam VRK-n ebből megállapítható, hogy a termék R_f értéke nagyon kicsi de eltér a többi szennyezőtől, így oszlopkromatográfiával

DCM:metanol 9:1 arányú elegyében tisztítottam a terméket. 5,44 mg narancsára sárga színű szilárd terméket kaptam (ez 18,3%-os kitermelést jelent). Ebben az esetben rosszabb a kitermelés mint a HPLC-vel történő tisztítás esetében. A fluoreszcens vizsgálatokhoz a termékből DMSO-ban oldatot készítettem minden esetben.

A **6.** vegyület előállításához 24,2 mg (0,098 mmol) **5.** reagáltattam 53 mg (0,30 mmol) D-cisztein hidrokloriddal. A **5.** 40 ml etanolban oldottam, majd hozzáadtam nitrogén atmoszférában a D-cisztein vizes oldatát (5 ml vízben oldva) 0,5 M-os K_2CO_3 -al pH = 8- ra beállítva. A **4.** vegyület tisztításához hasonlóan tisztítottam. A tisztítás után 6,541 mg élénksárga szilárd terméket kaptam (19,6%-os kitermelés). A termékünk nem futtatható jól VRK-n csak n-Bu:jégecet:víz 4:1:1 arányú elegyében, a termék ebben az esetben a zöldeskék színnel fluoreszkáló folt lett. A fluoreszcens vizsgálatokhoz a termékből DMSO-ban oldatot készítettem. A reakciót ebben az esetben is ismét elvégeztem, a nyerterméket HPLC-vel tisztítottam. A vegyülettel a biolumineszcens vizsgálatok még nem lettek elvégezve.

Az **8.** vegyület előállításához 0,398 g (2,6 mmol) **7.** reagáltattam 0,2 ml (3,1 mmol) bróm-acetonitrillel, 4,8 ml acetonban 3 órán át, reflux hőmérsékleten 0,542 g K_2CO_3 jelenlétében. A reakció lejátszódását VKR-val követtem. Az eluens hexán-EtOAc 1:1 arányú elegye volt, ebben az esetben a termékünk R_f értéke 0,5, a kiindulási anyagé 0,714. A tisztítást az első vegyülethez hasonlóan végeztem először extrakcióval, majd az oldószer eltávolítása után oszlopkromatográfiás tisztással. A reakció végén 0,377 g fehér szilárd anyagot kaptam (75,4%-os kitermelés). 1H NMR: δ 10,23 (s, 1H), 7,86 (d, $J = 9$, 1H), 6,687 (dd, $J = 2,4$ $J = 9$, 1H), 6,53 (d, $J = 2,2$ 1H), 4,89 (s, 2H), 3,89 (s, 1H); ^{13}C NMR: 187,0; 165,7; 159,8; 131,6; 119,9; 114,3; 108,2; 99,2; 55,8; 53,9.

A **9.** vegyület előállításához 0,377 g (1,9 mmol) **8.**-t oldottam 19 ml DMF-ben és 100°C-on 2 órán keresztül reagáltattam 0,377 g (2,7 mmol) K_2CO_3 -al. A reakciót VRK-val követtem hexán-EtOAc 1:1 elegyet használva eluensként. A termékről az oldószert eltávolítottam és hexán-EtOAc eluenst használva szilikagélen tisztítottam. Ekkor 0,220 g halványsárga szilárd terméket kaptam (65,6%-os kitermelés). 1H NMR: δ 7,36 (m, 1H), 7,25 (s, 1H), 6,85 (m, 2H), 3,75 (s, 3H); ^{13}C NMR: 161,4; 157,1; 126,7; 123,2; 119,1; 118,8; 115,4; 112,7; 95,8; 56,0.

A **10.** vegyület előállításához 22,0 mg (0,127 mmol) **9.** reagáltattam 66,93 mg (0,381 mmol) D-cisztein hidrokloriddal 24 órán keresztül 60 °C-on nitrogén atmoszférában sötétben. A **9.** 40 ml etanolban oldottam, majd hozzáadtam nitrogén atmoszférában a D-cisztein vizes oldatát (6 ml vízben oldva) 0,5 M-os K₂CO₃-al pH = 8- ra beállítva. A kapott vegyületet a **3-**hoz hasonlóan tisztítottam. A tisztítás után 7,200 mg halványsárga szilárd terméket kaptam (20,4%-os kitermelés). A termék kék színnel fluoreszkált. A fluoreszcens vizsgálathoz a terméket DMSO-ban oldottam. Így a további vizsgálatokhoz még szükség van a vegyület előállítására. Ehhez 18 mg (0,104 mmol) **9.** reagáltattam 55,3 mg (0,313 mmol) D-cisztein hidrokloriddal reagáltattam a fent leírt módon.

A **12.** vegyület előállításához 119,9 mg (0,38 mmol) **11.** vegyületet reagáltattam 90 mg (0,28 mmol) bórsavészterrel 8 ml dioxánban oldva 22 mg Pd(PPh₃)₄ és 469 mg CsF katalizátor jelenlétében. A kiindulási anyag dioxános oldata sárga színű. A reakció 100 °C-on két óra alatt lejár szódik, ekkor Pd kiválás tapasztalható, a reakcióelegy zöldül majd fekete színű lesz. A reakciót VRK lapon követte Hex:EtOAc 2:1 elegyben. A kiindulási anyag R_f értéke 0,8, a terméké 0,65 körül található, ez élénksárga foltként látható a VRK lapon. A katalizátort celiten szűrtem, a szűrőt 20 ml EtOAc-al mostam. A szűrletet 10 ml vízzel extraháltam, majd 10 ml cc. NaCl-al mostam és MgSO₄-en szárítottam, majd berotáltam celitere. Oszlopkromatográfiásan tisztítottam a nyersterméket, az eluens Hex:EtOAc 5:1-ről indult Hex:EtOAc 2:1-ig. A megfelelő kémcsöveket berotálva 90 mg élénksárga szilárd anyagot kaptam. ¹H NMR: (250 MHz, DMSO) δ: 7.88 (d, J=8.2 Hz, 2H), 7.59 (d, J=9.1 Hz, 1H), 7.50 (d, J=8.2 Hz, 2H), 6.73 (dd, J=9.1, 2.4 Hz, 1H), 6.55 (d, J=2.3 Hz, 1H), 3.44 (q, J=6.9 Hz, 4H), 2.17 (s, 3H), 1.12 (t, J=6.9, 6H),

A **13.** vegyület előállításához 37,0 mg (0,111 mmol) **12.** reagáltattam 60 mg (0,50 mmol) D-cisztein-hidrokloriddal 24 órán keresztül 60 °C-on nitrogén atmoszférában, sötétben. A **12.** 40 ml etanolban oldottam, majd hozzáadtam nitrogén atmoszférában a D-cisztein vizes oldatát (6 ml vízben oldva) 0,5 M-os K₂CO₃-al pH = 8- ra beállítva. A termék a VRK lapon leragadó narancssárga foltként látható. A terméket HPLC-vel tisztítottam. A termékkel még nem lettek elvégezve a biolumineszcens vizsgálatok.

6. Összefoglalás, távlati tervek

A laboratóriumi munkám során sikerült előállítani a négy luciferin származékot. Ezekről két esetben megállapítottam, hogy fénnnyel való gerjesztés hatására, valóban az eredeti szentjánosbogár luciferinhez és az eddig szintetizált származékokhoz képest a látható spektrum kék tartományában fluoreszkálnak. Továbbá két esetben sikerült elvégezni a biolumineszcens vizsgálatokat is.

A továbbiakban tervezem a további két vegyület biolumineszcens vizsgálatát. Ezeket a elvégezve az előállított vegyületek alkalmasak lehetnek a jövőben különböző, biolumineszcencián alapuló biológiai képalkotó eljárásokban történő felhasználásra.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kele Péternek, hogy felhívta a figyelmemet a lumineszens reakciók szépségére, majd lehetőséget adott rá, hogy részt vegyek a biolumineszcens vegyületek kutatásban is. A laboratóriumi munkában nyújtott segítségért a kutatócsoport összes tagjának, különösképpen Cserép Gergelynek, Demeter Orsolyának és Herner Andrásnak.

8. Irodalomjegyzék

- [1] **J. Lloyd**, Lampyridae, in R. H. Arnett, JR, M. C. Thomas, P. E. Skelley, J. H. Frank (ed.): CRC Press, **2002**, 187-197
- [2] **J. Lee**, *Journal of Siberian Federal University*, **2008**, 3, 194-205
- [3] **V. R. Viviani**, *Cell. Mol. Life Sci* **2002**, 59 1833–1850
- [4] **G. Meroni**, M. Rajabi, E. Santaniello, *Arkivoc*, **2009**, 1, 265-288
- [5] **A. Roda**, M. Guardigli, E. Michelini, M. Mirasoli, P. Pasini, *Anal. Chem.* **2003**, 11., 462A-470A
- [6] **H. Spielmann**, et al., *Anal Bioch.* **1981**, 113, 172-178
- [7] **A. Roda**, M. Guardigli, E. Michelini, M. Mirasoli, *Trends Anal. Chem.* **2009**, 28, 307-308
- [8] **N. Thorne**, J. Inglese, and D. S. Auldl, *Chem. & Bio.* **2010**, 17, 646-657
- [9] **N. R. Conley**, A. Dragulescu-Andrasi, J. Rao, and W. E. Moerner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 3350 –3353
- [10] **Y. Q. Sun**, J. Liu, P. Wang, J. Zhang, W. Guo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 8428 – 8430
- [11] **M. Isobe**, H. Takahashi, K. Usami, M. Hattori, Y. Nishigohri, *Pure & Appl. Chem.* **1994** Vol. 66, No. 4, pp. 765-772
- [12] **C. Miura**, M. Kiyama, S. Iwano, K. Ito, R. Obata, T. Hirano, S. Maki, H. Niwa, *Tetrahedron* **2013**, 69. 9726-9734
- [13] **C. C. Woodroffe**, P. L. Meisenheimer, D.H. Klaubert, Y. Kovic, J. C. Rosenberg, C. E. Behney, T. L. Southworth, B. R. Branchini, *Biochemistry*, **2012**, 51, 9807–9813
- [14] **D. C. McCutcheon**, M. A. Paley, R. C. Steinhardt, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 7604–7607

- [15] **M. Hirose**, M. Okaniwa, T. Miyazaki, T. Imada, T. Ohashi, Y. Tanaka, T. Arita, M. Yabuki, T. Kawamoto, S. Tsutsumi, A. Sumita, T. Takagi, B.-C. Sang, J. Yano, K. Aertgeerts, S. Yoshida, T. Ishikawa, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 5600-5615
- [16] **T. Hirota**, Hiroko Fujita, Kenji Sasaki, Tetsuto Namba, Shohei Hayakawa, *J. Heterocyclic Chem.* **1986** 23, 1347 – 1351
- [17] **W. Zhou**, W. Chena, L. Wang, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 4172
- [18] **J. Lee**, S. P. Khanapure, H. Kim, R. (S. B.) Rajur, B. Li, J. D. Williams, R. Pai, N. P. Peet, *Synthetic Communications*, **2010**, 40: 3390–3396
- [19] **H. Takakura**, K. Sasakura, T. Ueno, Y. Urano, T. Terai, K. Hanaoka, T. Tsuboi, T. Nagano, *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 2053 – 2061