

# **Szupramolekuláris rendszerek előállítása sztochasztikus szuperfelbontású mikroszkópiához**

TDK dolgozat

**FRICS MÁRTON**

Témavezetők:

Dr. Kormos Attila, Dr. Kele Péter  
TTK Kémiai Biológia Kutatócsoport



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest  
Természettudományi Kar  
Kémiai Intézet

**Dolgozat lezárása:  
2022.11.14.**

# **1. Köszönetnyilvánítás**

Első sorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek: Dr. Kormos Attilának és Dr. Kele Péternek, valamint a sejtes kísérletekben nyújtott segítségéért Dr. Szatmári Ágnesnek. Ezen kívül köszönöm Dr. Németh Krisztinának, Dr. Bojtár Mártonnak és Egyed Alexandrának, hogy a témában szerzett tapasztalataikkal segítették a munkámat.

Köszönöm a Kémiai Biológia Kutatócsoportnak és a TTK Szerves Kémiai Intézet azon munkatársainak, akik anyagokkal, műszerhozzáféréssel és a műszerhasználattal kapcsolatos segítséggel hozzájárultak ehhez a kutatáshoz.

Köszönöm a Természettudományi Kutatóközpontnak, hogy lehetőséget biztosított a TDK dolgozatomhoz szükséges kutatómunkára.

## 2. Tartalomjegyzék

|                                                                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Köszönetnyilvánítás .....                                                                                                                 | 2.  |
| 2. Tartalomjegyzék.....                                                                                                                      | 3.  |
| 3. Bevezetés .....                                                                                                                           | 4.  |
| 4. Irodalmi bevezető .....                                                                                                                   | 5.  |
| 4.1. Szuperfelbontású mikroszkópia.....                                                                                                      | 5.  |
| 4.1.1. <i>Blinking</i> pufferral működő festékek .....                                                                                       | 6.  |
| 4.1.2. Fénnyel aktiválható festékek .....                                                                                                    | 7.  |
| 4.1.3. Spontán <i>blinkingre</i> képes festékek .....                                                                                        | 8.  |
| 4.1.4. PAINT .....                                                                                                                           | 9.  |
| 4.1.5. <i>Host-guest</i> komplexképzésen alapuló festékek .....                                                                              | 9.  |
| 4.2. Makrociklusok.....                                                                                                                      | 11. |
| 4.2.1. Makrociklusok szupramolekuláris receptorként való alkalmazása .....                                                                   | 11. |
| 4.2.2. Pillér[n]arén makrociklusok .....                                                                                                     | 12. |
| 4.3. Bioortogonális reakciók.....                                                                                                            | 14. |
| 5. Célkitűzések.....                                                                                                                         | 16. |
| 6. Saját munka ismertetése.....                                                                                                              | 19. |
| 6.1. Pillér[n]arén (n=5, 6) makrociklusok szintézise és monofunkcionálása .....                                                              | 19. |
| 6.2. Fluorofór <i>guest</i> festékek szintézise .....                                                                                        | 22. |
| 6.3. Pillér[5]arén – fluorofór szupramolekuláris rendszerek vizsgálata.....                                                                  | 26. |
| 6.4. Nagy Stokes eltolódású fluorofór festékek szintézise.....                                                                               | 32. |
| 7. Eredmények összefoglalása .....                                                                                                           | 42. |
| 8. Kísérleti rész .....                                                                                                                      | 45. |
| 8.1. Általános.....                                                                                                                          | 45. |
| 8.2. Szintézisek .....                                                                                                                       | 46. |
| 8.3. Biológiai kísérletek .....                                                                                                              | 67. |
| 8.3.1. HEK293T sejtek passzálása.....                                                                                                        | 67. |
| 8.3.2. Inzulinreceptorok jelölése bioortogonálisan reaktív csoporton keresztül WP5-t<br>pillér[5]arén származékkal és a sejtek fixálása..... | 67. |
| 8.3.3. Fluoreszcens konfokális mikroszkópos vizsgálatok.....                                                                                 | 67. |
| 9. Irodalomjegyzék.....                                                                                                                      | 68. |

### 3. Bevezetés

A fluoreszcens mikroszkópia a sejtszintű vizsgálatok alapvető módszere, előnye, hogy non-invazív és szubcelluláris struktúrák érzékeny, nagy felbontású képalkotására alkalmas. A mikroszkópokkal kapcsolatos fejlesztések két fő területe a különböző sejt- vagy szövetrészek specifikus láthatóvá tétele és a felbontóképesség további növelése. A közelmúlt módszertani és technikai fejlesztéseinek köszönhetően jöttek létre az ún. szuperfelbontású képalkotási eljárások, melyekkel az optikai mikroszkópok elméleti, diffrakció limitált felbontóképessége alatti mérettartomány is láthatóvá vált fluoreszcens mikroszkópok segítségével. E felfedezésekért 2014-ben Hell, Moerner és Betzig kémiai Nobel-díjat kaptak. <sup>1</sup> A szuperfelbontású megközelítések alapvetően két nagy csoportra, determinisztikus és sztochasztikus eljárásokra oszthatók. Az előbbibe tartozó, stimulált kioltáson alapuló technika (STED) a gerjesztő fénynyaláb körül koncentrikusan alkalmazott kioltó köpenylézer segítségével csökkenti a fókuszpontot. A sztochasztikus módszerek ezzel szemben azon alapulnak, hogy egyidejűleg csak kisszámú fluorofórt hoznak gerjesztett állapotba, melynek köszönhetően az emittáló fénypontok a diffrakciós limiten túl helyezkednek el egymástól, így pozíciójuk nagy pontossággal meghatározható (*single-molecule localization*, SML). Míg a determinisztikus módszerek a teljes mintát pásztázzák, a sztochasztikus eljárások a vizsgált objektum egészéről készítenek rengeteg felvételt. Mivel mindig más jelzővegyület-populációról készül felvétel, ezeket egymásra illesztve kapják a vizsgált struktúrák szuperfelbontású képét. A különféle sztochasztikus módszerek abban térnek el, hogyan érik el, hogy egyszerre csak kevés jelzővegyület jusson gerjesztett, emisszív formába, majd jusson vissza sötét állapotba, véletlenszerű felvillanásokat (*blinking*) eredményezve. Számos fluoreszcens vegyület jellemezhető teljesen kioltott vagy alacsony intenzitású fluoreszcenciával vizes közegben. Apoláros környezetbe jutva viszont intenzíven fluoreszkálnak. Az irodalomban leírtak olyan SML módszert, ahol makrociklusok üregében (ligandum) ideiglenesen megkötődő és ott fluoreszcenssé váló vendégmolekulákkal értek el véletlenszerű felvillanást.

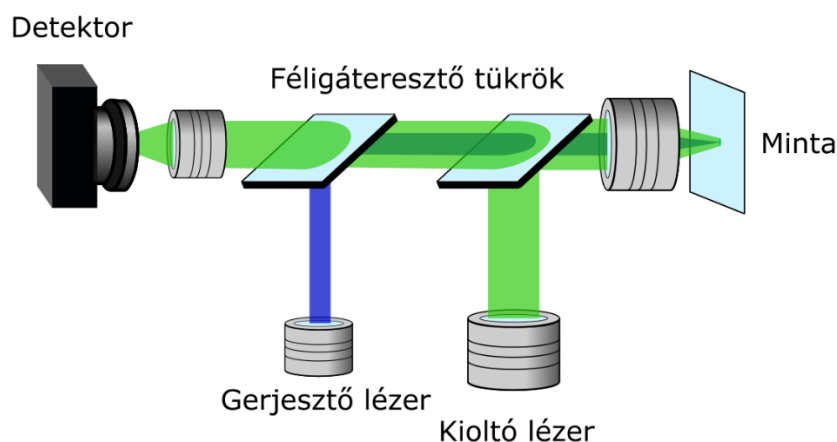
Kutatómunkám során olyan pillér[n]arén (n=5,6) ligandumokból és különféle fluoreszcens vendégmolekulákból álló rendszereket állítottam elő és vizsgáltam, melyek alkalmasak lehetnek SML mikroszkópiára. Nagy Stokes-eltolódású vendégmolekulát használva alkalmasak lehetnek más SML festékekkel párhuzamos alkalmazásra (többszínű SML mikroszkópiára). A tervezett makrociklusos ligandum bioortogonális klikk-reakcióval köthető a sejtekhez, ami potenciálisan alkalmassá teszi a rendszert élő sejt alkalmazásra is.

## 4. Irodalmi bevezető

### 4.1. Szuperfelbontású mikroszkópia

Szuperfelbontású mikroszkópiának azokat a fluoreszcens detektáláson alapuló mikroszkópos módszereket nevezzük, melyek a diffrakciós limit alatti felbontóképességet tesznek lehetővé. A gyakorlatban ez a 200 nm-es feloldási küszöb alatti felbontóképességet jelenti. E technikákat két fő csoportba sorolhatjuk, úgymint determinisztikus és sztochasztikus eljárások.

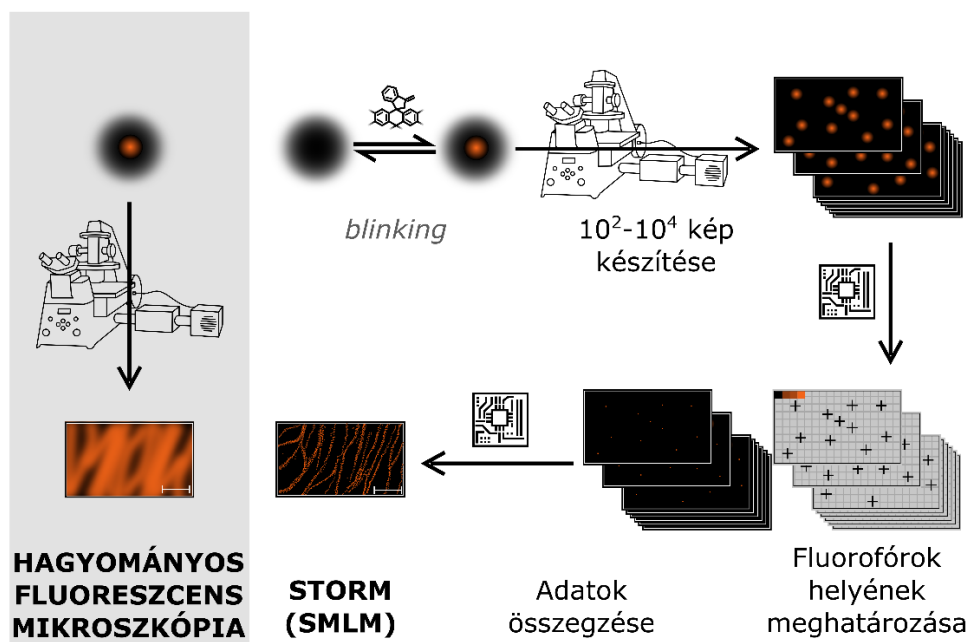
A determinisztikus szuperfelbontású mikroszkópiai megoldásokra egy gyakran használt példa a STED (*stimulated emission depletion microscopy*). A technika a konfokális mikroszkópián alapul, vagyis itt is egy pontba fókuszált gerjesztőlézer pásztázza végig a mintát. A klasszikus konfokális mikroszkópiával azonban nem lehet szuperfelbontást elérni, mert a diffrakció miatt a gerjesztő fénynyalábot nem lehet a gerjesztő fény hullámhosszának felénél kisebb átmérőjű területre fókuszálni. A STED ezt egy eltérő hullámhosszú, kioltó lézerrel oldja meg, amelyet koncentrikusan a gerjesztő sugár köré irányítanak, akár szimultán, akár egymást követően (1. ábra).<sup>2</sup>



1. ábra. A STED módszer vázlata.

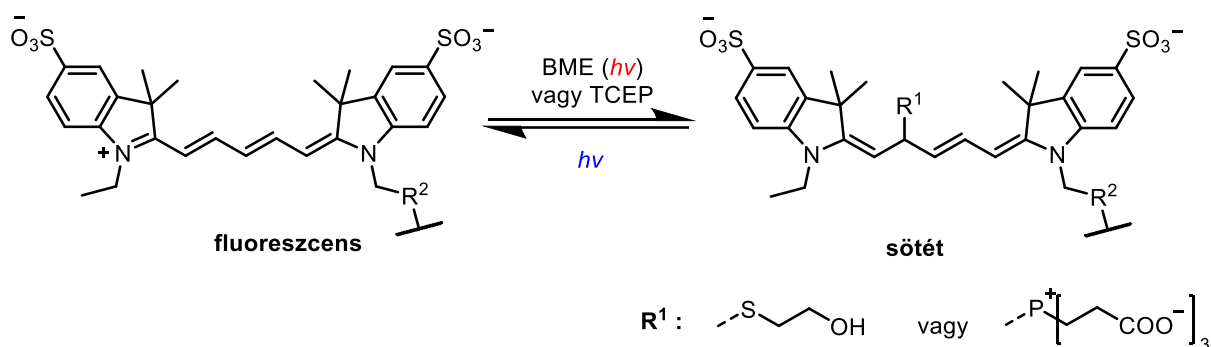
A sztochasztikus módszerek ezzel szemben speciális festékekkel és számítógépes képfeldolgozó módszerekkel érik el a diffrakciós limitnél jobb felbontást. Ezek a módszerek pásztázás helyett az egész mintáról készítenek sok képet egymás után. A felhasznált festékek fluoreszcenciájának megfelelő arányú ki-be kapcsolása miatt minden képen csak egymástól a diffrakciós határon kívül eső festékmolekulák fényfoltjai látszanak. A képeken először egy program egyenként Gauss-görbét illeszt a fényfoltok intenzitására és azok maximumának megfelelő helyű és intenzitású képpontokból építi fel a végső, összesített képet (2. ábra). A

különböző sztochasztikus módszerek abban térnek el, hogy hogyan érik el a festékek felvillanását (*blinking*).



**2. ábra.** Az SML mikroszkópia és a hagyományos fluoreszcens mikroszkópia folyamatának összehasonlítása.

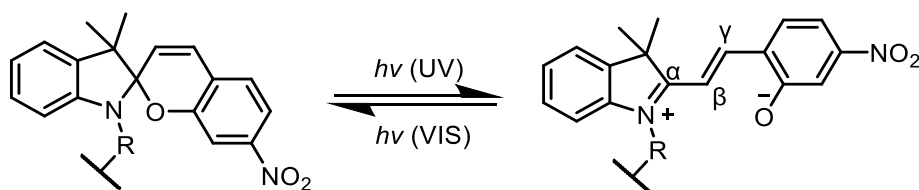
**4.1.1. *Blinking* pufferrel működő festékek.** Az ebbe a csoportba tartozó festékek olyan reverzibilis kémiai reakcióban vesznek részt az alkalmazott puffer vegyületeivel, melyek fluoreszcens és nem-fluoreszcens formákat eredményeznek. A leggyakrabban alkalmazott ilyen típusú jelzővegyületek a cianinok (3. ábra). Ezeknek a vegyületeknek a fluoreszcens tulajdonságát a kiterjedt, konjugált kettőskötés-rendszer okozza, a fluoreszcencia kioltásáért pedig ennek az elektronrendszernek a megbontásával járó reakció felelős. A *blinking* puffereknek két fő komponense a redukálószer, mint pl. a  $\beta$ -merkaptotanol (BME)<sup>3</sup> vagy a trisz-2-karboxietil-foszfín (TCEP)<sup>4</sup> és egy enzimatis oxigéngyök-fogó (scavenger) rendszer. A redukálószer fény hatására addicionálódik a cianinok kettős kötéseire, mely a fluoreszcencia kioltását eredményezi. Ez az állapot termikusan egyensúlyi folyamatban vagy UV fény hatására visszaalakul az emisszív formába. Az oxigén scavenger szerepe a fluorofórok fotodegradációjának megakadályozása. A puffer koncentrációját úgy állítják be, hogy az egyensúly a nem-fluoreszcens forma felé legyen eltolódva, így egy időben egyszerre csak kevés fluoreszcens jelzővegyület lesz jelen a rendszerben.



**3. ábra.** A Cy5 sötét és világos formája közötti váltakozást okozó reakciók.

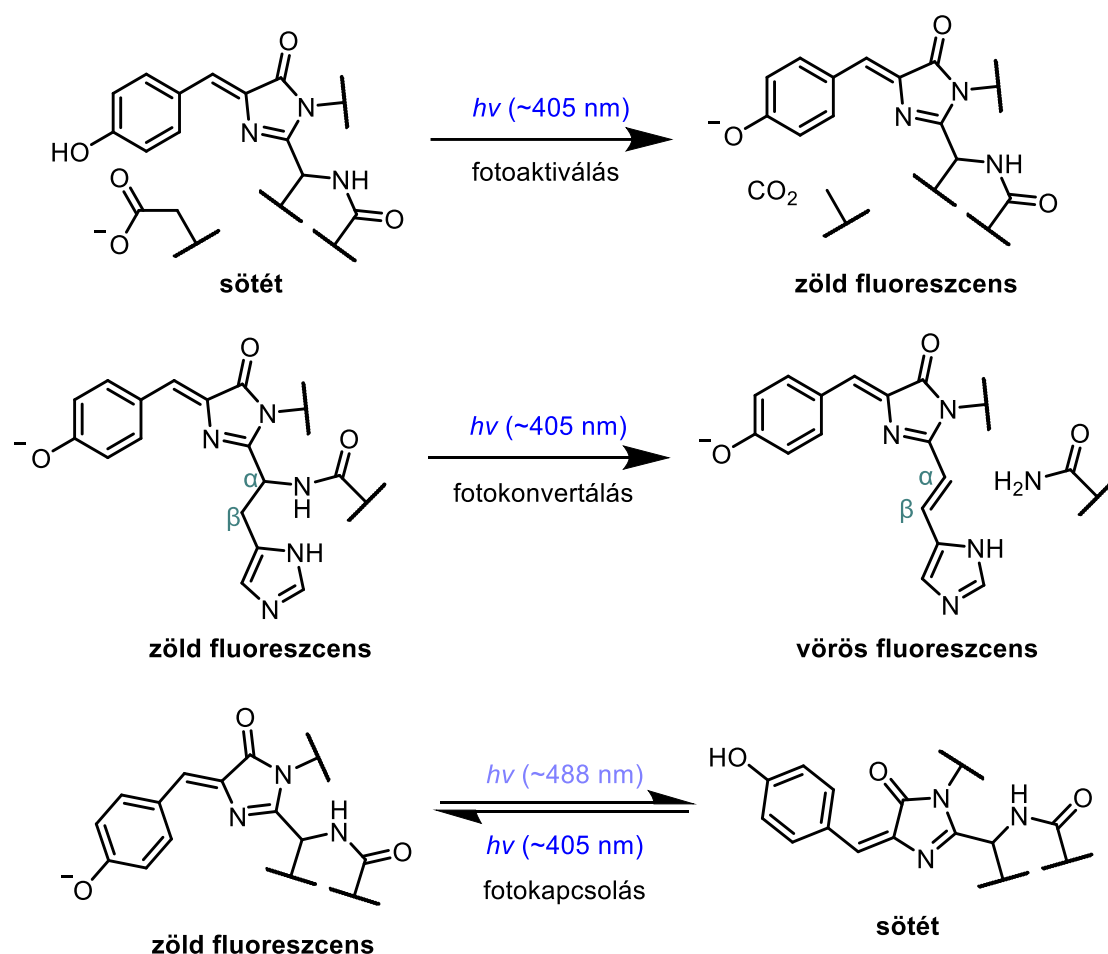
(BME:  $\beta$ -merkaptóetanol; TCEP: trisz-2-karboxietil-foszfin) <sup>5</sup>

**4.1.2. Fénnyel aktiválható festékek.** Sok festék kioltásáért és bekapcsolásáért fény hatására végbemenő reakciók felelősek. A fluoreszcens és a kioltott változat arányát a képződésükhöz szükséges fény intenzitásával lehet változtatni. Erre a módszerre példa a spiropiránok (SP-k) csoportja (4. ábra). <sup>6</sup> A kioltásért egy molekulán belüli spirociklizációs reakció felel. Ez a reakció az  $\alpha$ -szénatom elektronszerkezetének hibridizációját változtatja meg  $sp^2$ -ről  $sp^3$ -ra, így megtöri a nitrogén és  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -szénatomok közti delokalizált elektronrendszert.



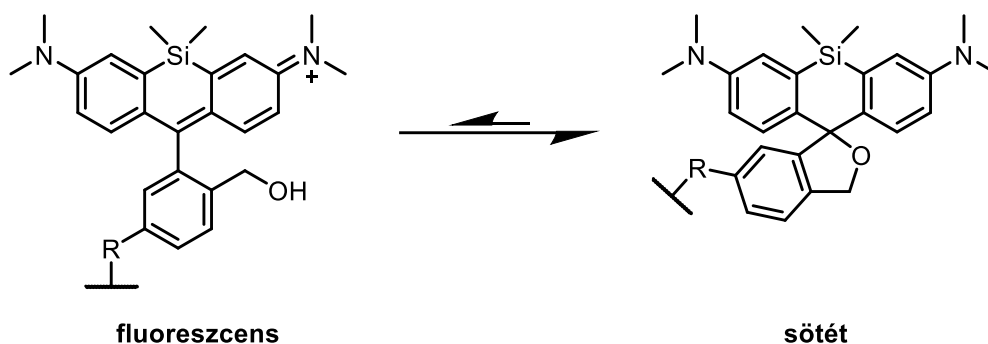
**4. ábra.** Példa a spiropiránok gyűrűzáródására és felnyílására. <sup>5</sup>

Másik példa fotoaktiválhatóságra a fluoreszcens fehérjék (FP-k) csoportja. A bekapcsolásuk módja szerint három fajtájukat lehet megkülönböztetni: fotoaktiválhatók (PA-FP-k), fotokonvertálhatók (PC-FP-k) és fotokapcsolhatók (FS-FP-k). Közülük az első kettő rövid hullámhosszú látható fény hatására lejátszódó, nem visszafordítható reakciók. A fotoaktiváláskor az eredeti funkciócsoport ionos formává alakulása miatt válik a fehérje zöldben emittáló fluorofórrá. A fotokonvertálásnál kettős kötés alakul ki az  $\alpha$  és  $\beta$  szénatomok között, így a két gyűrű között kiterjedt delokalizált elektronrendszert alakítva ki, így a fehérje eredeti zöld emissziója vörösbe tolódik el (5. ábra). Harmadik esetben a fény hatására a fluoreszcencia ki-bekapcsolható, a két forma közötti átalakulásokat különböző hullámhosszú látható fény váltja ki. <sup>7</sup>



**5. ábra.** Példa a fluoreszcens fehérjék fotoaktiváló, fotokonvertáló és fénnel kiváltott ki-be kapcsoló reakcióira. <sup>5</sup>

**4.1.3. Spontán *blinkingre* képes festékek.** Egyes festékek megfelelő pH-jú közegben további reagensek vagy besugárzás nélkül is képesek folyamatos ki-be kapcsolásra. Ezt általában egy egyensúlyi, molekulán belüli gyűrűzáródási reakció okozza (spirociklizáció). Spontán *blinkingre* képesek például bizonyos rodaminvegyületek. Ezekben a festékmolekulákban egy molekulán belüli nukleofilen, oxigénen keresztül történik a spirociklizáció (6. ábra). <sup>8</sup> Ideális esetben a zárt, azaz sötét változat felé van eltolva az egyensúly, mert a ki- és bekapcsolt festékek 1000:1 vagy annál is nagyobb aránya kedvez az SML képalkotásnak. <sup>5</sup>

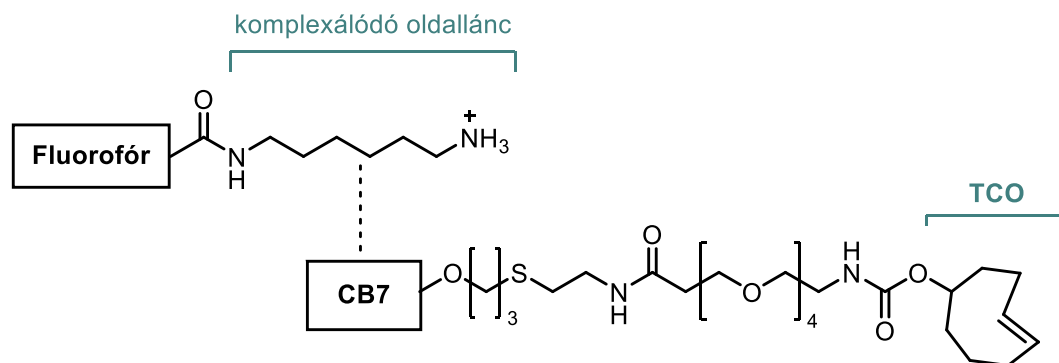
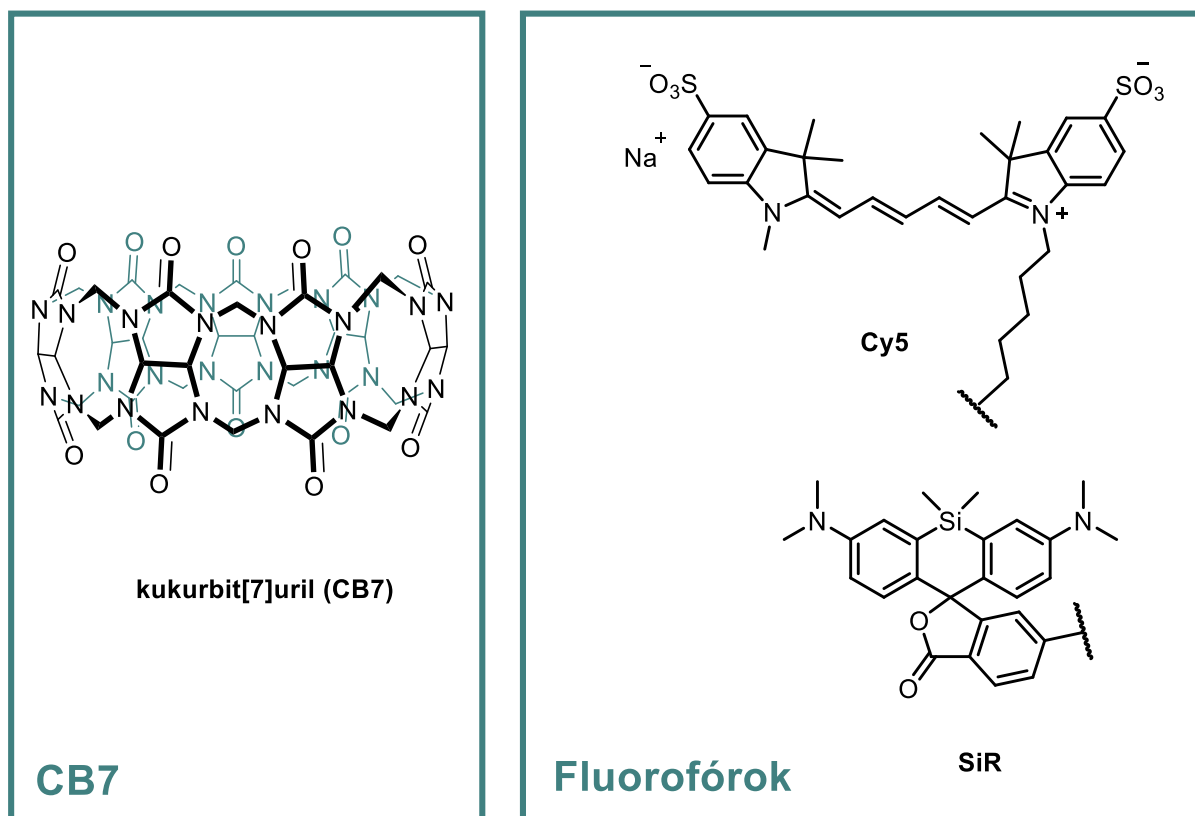


**6. ábra.** A HMSiR szilikorodamin spirogyűrűképző reakciója.

**4.1.4. PAINT.** A PAINT (point accumulation for imaging nanoscale microscopy) módszerek a többitől eltérően nem ki-be kapcsolható festékeket, hanem stabil fluoreszcens vegyületeket használnak. <sup>9</sup> A jelzőmolekulát ilyenkor olyan csoportokkal egészítik ki, amik nem befolyásolják az optikai tulajdonságait és másodlagos kölcsönhatásokkal átmenetileg képesek a festeni kívánt sejtalkotóhoz kötni. Legelterjedtebb alkalmazása a DNS-PAINT, aminek a lényege, hogy egyszálú DNS-t jelölnek meg fluorofórral (imaging strand), míg a jelölni kívánt struktúrához egy jelöletlen komplementer DNS-t kötnek (docking strand). Míg a szabadon diffundáló jelölt DNS szálak háttérként véletlenszerűen helyezkednek el, egy részük átmenetileg megkötődik a komplementer dokkoló szálhoz kapcsolódva. A felvételek során csak a tartósan egy helyben levő jeleket detektálják, így a nem kötött jelölt szálak fluoreszcenciáját nem. A módszer előnye, hogy szinte bármilyen fluoreszcens festék használható, valamint hogy nem kell számolni a fotodegradáció miatti jelcsökkenéssel (photobleaching), mivel a feleslegben alkalmazott jelölt szálaknak köszönhetően mindig új jelzővegyület kötődik meg. A módszer hátránya a különleges eljárást igénylő háttér csökkentése, valamint az asszociáció és disszociáció lassúsága.

**4.1.5. Host-guest komplexképzésen alapuló festékek.** A *host-guest* komplexképzés segítségével is elérhető a fluoreszcencia időleges ki-bekapcsolása. A módszer hasonló a PAINT-hez, ám megfelelő fluorofór-gazdamolekula pár alkalmazásával elérhető, hogy a vendégmolekula-ligandum kölcsönhatás során a fluoreszcens vegyület, mint ligandum emissziójának intenzitása megnő, így elkerülhető a PAINT-nél szükséges speciális detektálás a háttér csökkentésére. Az SML alkalmazás feltétele a host-guest kölcsönhatás megfelelő disszociációs állandója és a jelintenzitás változás kellő mértéke. Található példa az irodalomban mind a fluorofór, mind a gazdamolekula rögzítésén alapuló eljárásra. Az első esetben a vizsgálandó biomolekulákhoz kapcsolják a fluoreszcens festékmolekulákat, a közegbe pedig

egy makrociklusos molekulát oldanak, ami egyensúlyi folyamatban 1:1 komplexet képezhet a festékmolekulákkal.



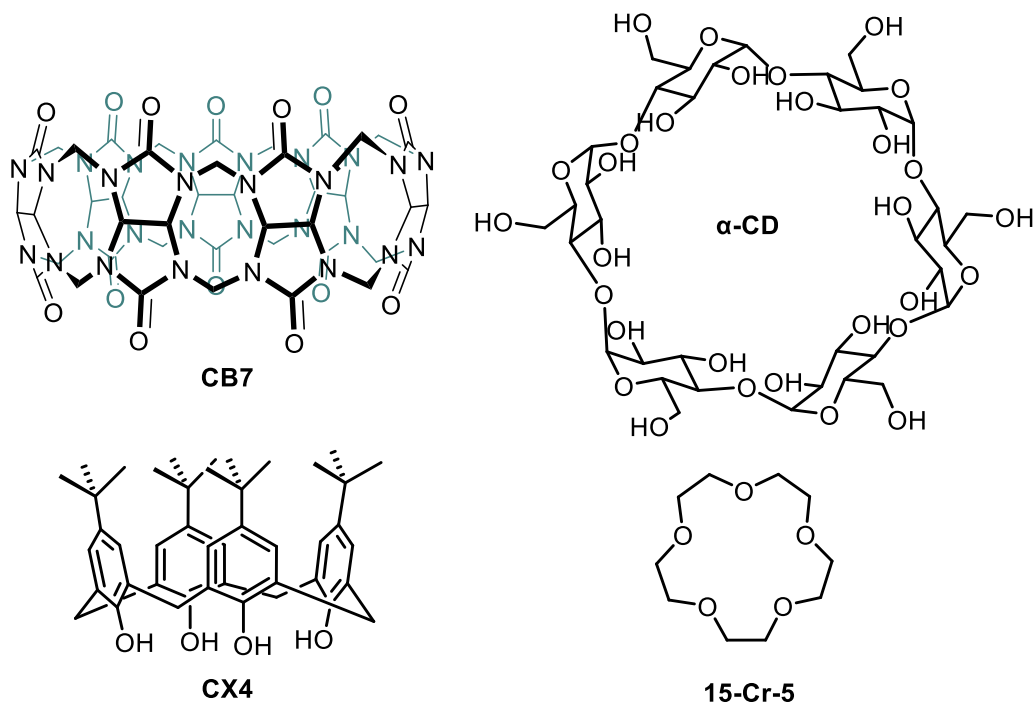
7. ábra. A kukurbit[7]uril és a vele komplexképző festékek szerkezete. <sup>10</sup>

Sasmal és munkatársai 2019-es cikkükben egy olyan módszert írtak le, ahol kukurbit[7]uril és vele komplexképzésre képes oldallánccal módosított SiR és Cy5 festékekkel több mint 100-szoros fluoreszcens intenzitásnövekedést ~121 ms-onkénti felvillanásokat tudtak elérni. Ezek a tulajdonságok lehetővé tették, hogy sikeresen készítsenek szuperfelbontású képeket több mint 10-szer jobb felbontásban, mint amire a diffrakciólimitált módszerek képesek. A CB7 makrociklusokat egy *transz*-cikloooktén (TCO), bioortogonális klikk-reakcióra képes csoporttal kötötték sejtstruktúrákhoz. <sup>10</sup>

Az igény felmerül többszínű-SMLM képalkotásra is, amikor különböző festékekkel festenek meg biomolekulákat, de az ismert SMLM festékek csak nagyon ritkán használhatóak egymás mellett. Ennek az oka, hogy a kromatikus aberráció zavaró hatását csak olyan festékekkel lehet kiküszöbölni, amelyek egymástól távoli hullámhosszokon gerjeszthetők, de ugyanazon a hullámhosszon detektálhatóak. Ebből adódik, hogy a festékek közül egynek vagy többnek nagy Stokes-eltolódásúnak kell lennie (vagyis egymástól távol esik a gerjesztő és emittált fény hullámhossza), de az eddigi SMLM festékek szinte mindig kis-Stokes eltolódásúak. Erre megoldást nyújthatnak a host-guest rendszerek, hiszen segítségükkel elméletben bármilyen festékváz alkalmassá tehető spontán blinkingre.

## 4.2. Makrociklusok

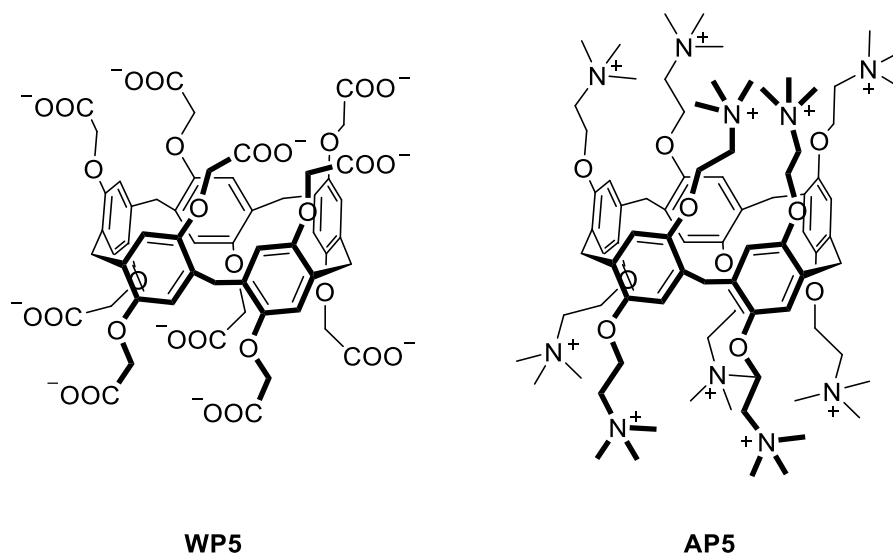
**4.2.1. Makrociklusok szupramolekuláris receptorként (ligandum, host) való alkalmazása.** A szupramolekuláris kémia egyik sokat kutatott része a makrociklusos molekulák csoportja. Ennek az oka, hogy alkalmasak ionok, kisméretű molekulák másodrendű kölcsönhatásokkal történő megkötésére így vendégmolekula-ligandum komplexeket kialakítani. Gyakran kutatott váztypusok például a kukurbiturilok, kalixarének, ciklodextrinek, koronaéterek (8. ábra).



**8. ábra.** Példák makrociklusokra: kukurbit[7]uril (CB7), kalix[4]arén (CX4), α-ciklodextrin (α-CD) és 15-Cr-5 koronaéter.

Az ilyen rendszerek egy részét az analitikai vagy mikroszkópai használatra alkalmatlanná teszi a gyenge vízzoldhatóságuk, ami sokszor javítható poláris funkcióscsoportokkal. Ezekkel a csoportokkal erős töltést kaphat a makrociklusok két „pereme”, miközben belsejükben apolárisak maradnak. Ez az oka pl. annak, hogy a kukurbiturilok többféle fémionnal is hajamosak komplexképzésre, ha elég erős negatív töltésük van a két szemközti oldalon, valamint egyes apoláris és ionos részt is tartalmazó szerves molekulák makrociklusokkal képzett 1:1 komplexeit is ez a töltéstöbblet stabilizálhatja.<sup>11</sup> Vizes közegben apoláris (vagy részben apoláris) szerves molekulák komplexálódásának elsődleges hajtóereje az apoláris kölcsönhatás a makrociklus belső részével. A gyűrűket alkotó monomerek tagszáma befolyásolja a makrociklusok belső átmérőjét és ez határozza meg, mekkora szerves molekulákat képesek befogadni. A szintézisük során általában többféle méretű ciklikus és nem ciklikus oligomer termék keletkezik, de különböző méretű kis molekulák templáthatását kihasználva eltolható egyik vagy másik tagszámú ciklus felé a képződő termékek aránya, szintén a komplexképző tulajdonságuk miatt.<sup>12</sup>

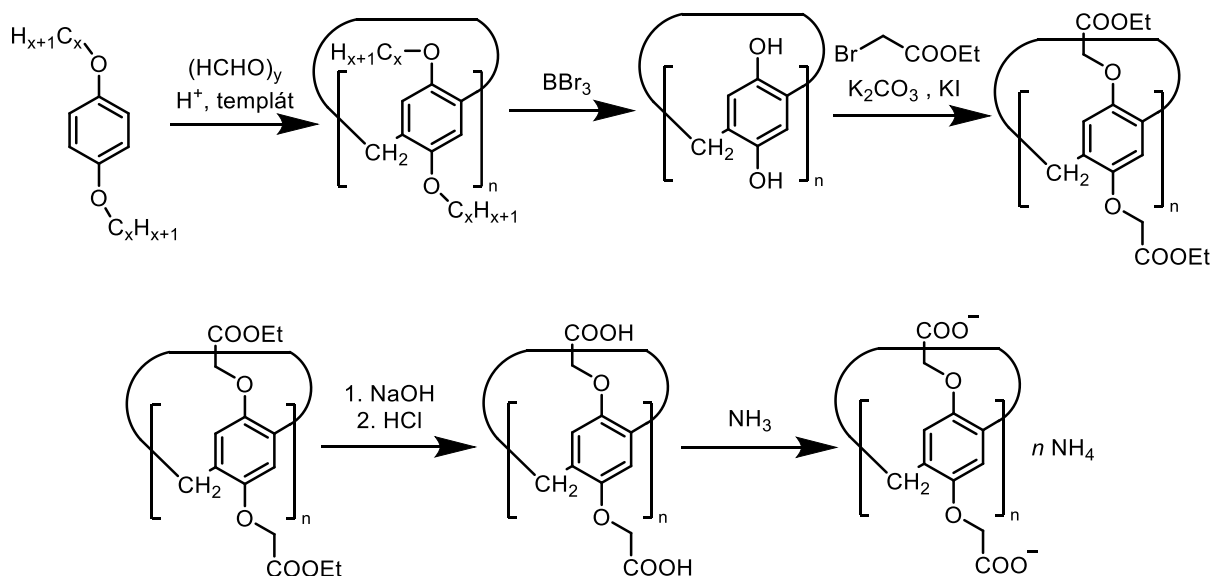
**4.2.2. Pillér[n]arén makrociklusok.** A pillérearének egy szintén gyakran kutatott, viszonylag újabb csoportja a szupramolekuláris rendszereknek. Hidrokinon vagy hidrokinon-származék egységekből épülnek fel, amik 2,4-helyzetben metiléneken keresztül kapcsolódnak össze. Előnyük, hogy karboxil- vagy kvaterner amincsoportokkal negatív vagy pozitív töltésű, ionos, vízben jól oldódó származékaik képezhetőek (9. ábra). Hátrányuk, hogy a legtöbb szintézismódszer a pillér[5]arén keletkezésének kedvez, az ettől eltérő tagszámú pillérearén ciklusokat nehéz jó termeléssel előállítani.



**9. ábra.** A karboxilcsoportokkal és kvaterner aminokkal kialakított ionos, vízoldható pillér[5]arén származékok.

Szintézisük általában a hidrokinon alkoxi-származék para-formaldehiddel való reakcióján alapul sav- és templátkatalizátor mellett (néha egy molekula látja el mindkét szerepet). Ezután dezalkilezéssel, brómecetsav-etilészter addíciójával, észterhidrolízissel és ammóniás sóképzéssel juthatunk el a negatív töltésű vízoldható pillér[n]arénhez (10. ábra).<sup>13</sup>

A WP5 segítségével megvalósítható sztíril-piridínium típusú festékek komplexképzése, mely a festékváz szerkezetétől függően az emisszió intenzitásának növekedésével vagy csökkenésével is járhat.<sup>14</sup> Továbbá a WP5 képes komplexet képezni bizonyos diaminoalkánokkal (pl. putreszcin, kadaverin, 1,6-diaminohexán).<sup>15</sup> Elméletben ezeket az aminokat festékvázhoz kötve tetszőleges fluorofór alkalmassá tehető a WP5-tel történő komplexképzésre.

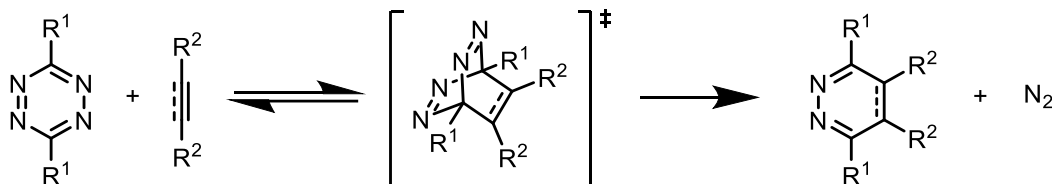


### 4.3. Bioortogonális reakciók

Élő rendszerek kémiai manipulálására a legideálisabbak olyan szervezetidegen funkciócsoportok közti reakciók, melyek biológiailag (*bio*) és kémiailag is inerteek, kizárólag (*ortogonális*) egymással lépnek gyors és hatékony reakcióba, miközben stabil kovalens kötést alakítanak ki. Az ilyen reakciókat bioortogonálisnak nevezzük, felfedezésükért és az azt megalapozó kutatásaikért Bertozzi, Meldal és Sharpless 2022-ben megosztva kémiai Nobel-díjat kapott. <sup>16</sup>

A jelölés stratégiája két lépésből áll. Először egy ún. „kémiai hírvivővel” kell módosítani a jelölni kívánt biomolekulát. Ez történhet metabolikus úton, bioortogonalizált építőegységek (pl. cukrok, lipidek, nukleotidok) segítségével, vagy fehérjék esetében a genetikai kód kiterjesztése által, bioortogonalizált aminosavak transzláció során történő beépítésével. Második lépésként olyan jelzővegyületet juttatunk a sejtbe, ami a komplementer bioortogonális funkciót hordozza. <sup>17</sup>

A bioortogonalitás feltételeinek kevés reakció felel meg, ezek közül a leggyakrabban alkalmazott a tetrazinok és feszültgyűrűs cikloalkének/cikloalkinok közti inverz elektronigényű Diels-Alder reakció (11. ábra). A hagyományos Diels-Alder reakcióktól eltérően itt a dién elektronban szegény, míg a dienofil elektronban gazdagabb.



11. ábra. Inverz elektronigényű Diels-Alder reakciók általános formája. <sup>18</sup>

Mind az 1,2,4,5-tetrazinok, mind pedig a cikloalkének, cikloalkinok, szervezetidegen, biológiailag és kémiailag is inert funkciócsoportok, Diels-Alder reakciójuk sebessége pedig a leggyorsabb a bioortogonális reakciók közt. <sup>18</sup>

## 5. Célkitűzések

A többszínű sztochasztikus szuperfelbontású mikroszkópia módszerének kidolgozása régóta komoly kihívást jelent a SMLM fejlesztésében. A többszínű esetben azt jelenti, hogy kettő vagy több festéket alkalmaznak párhuzamosan, más struktúrákat jelölve és a fluorofórokat különböző hullámhosszú lézerekkel szelektíven, felváltva gerjesztve érjük el a többszínű képet. Ennek legfőbb akadálya, hogy az eddig leírt SML festékek kis Stokes eltolódása nem teszi lehetővé a szelektív gerjesztést. A különböző elven, különböző környezetben működő *blinking* festékek szintén korlátozzák az azonos mintában való alkalmazást.

A kutatási cél kitűzésénél abból indultunk ki, hogy a probléma megoldása lehet egy olyan festék, amely nagy Stokes eltolódású, és nem igényel speciális reagenst vagy fényhatást a fluoreszcencia ki-be kapcsolása. Erre a célra ígéretes jelöltnek bizonyulnak a pillérarén *host* – fluorofór *guest* rendszerek. A fluoreszcens vegyület fajtája (így az optikai tulajdonságai is) ebben az esetben viszonylag szabadon választható, nem feltétel, hogy képes legyen önállóan *blinkingre*. Az alapvető (pl. oldhatósági) feltételeken túl ezekkel a festékekkel szemben az az elvárás, hogy

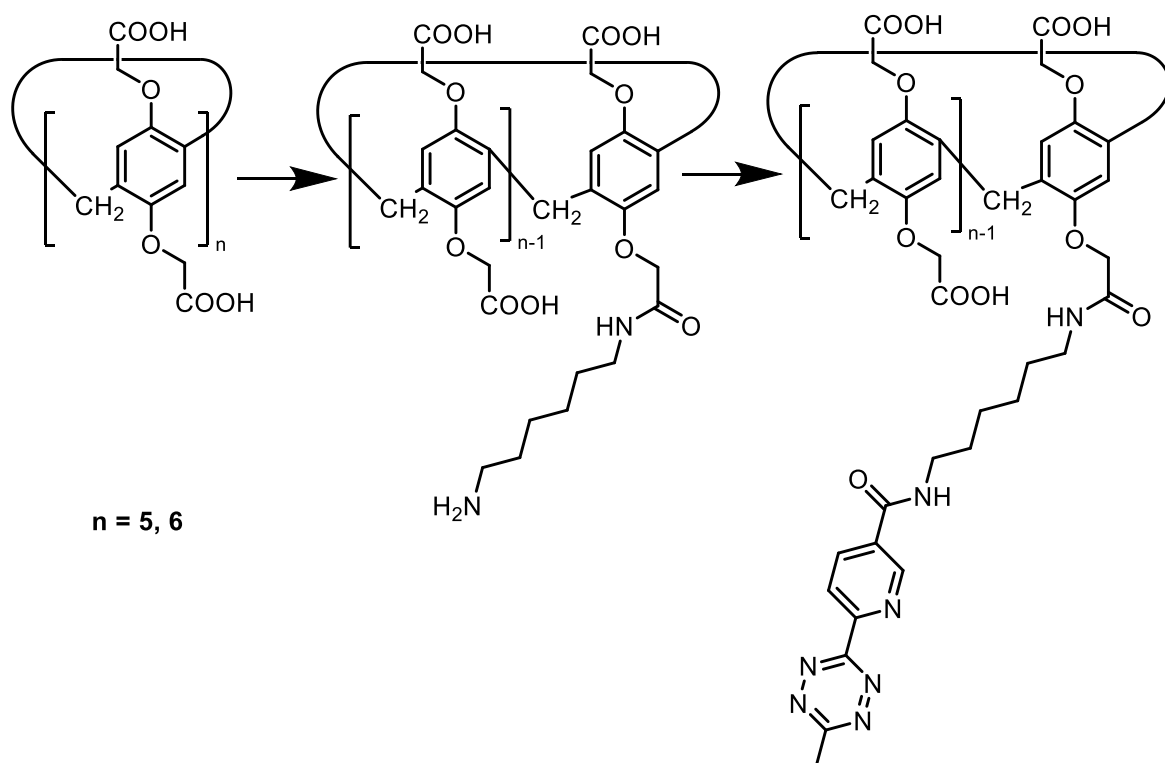
- fluoreszcenciája oldott formában kioltott legyen
- alkalmas legyen a pillérarénnel 1:1 komplex képzésére, melynek stabilitása 1:100 vagy kisebb komplexált – szabad festékmolekulaarányt eredményez
- a makrociklussal asszociált formában nyerje vissza a fluoreszcens tulajdonságot.

A makrociklust pedig úgy kell módosítani, hogy a kívánt biológiai struktúrához lehessen kapcsolni, például bioortogonális klikk-reakcióval.

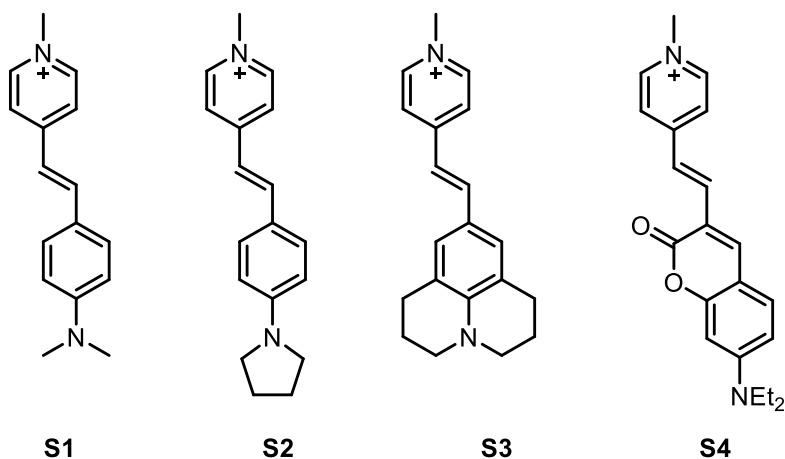
Ennek megfelelően kutatómunkám egyik célja a pillér[5]arén és pillér[6]arén előállítás és *linkeren* keresztül inverz elektronigényű Diels-Alder reakcióra alkalmas 1,2,4,5-tetrazinnal való ellátása volt. (12. ábra)

A komplexképzés ellenőrzéséhez és a koncepció mikroszkópos teszteléséhez először már korábban leírt, nem nagy Stokes-eltolódású, egyszerű szerkezetű vegyületek szintézise volt a célom. Az, hogy a stilbazólium szerkezetű **S1** molekula komplexképzése pillér[5]arénnel ~30-szoros fluoreszcens intenzitásnövekedést eredményez, ismert jelenség.<sup>19</sup> Ebből kiindulva,

először az **S1**, **S2**, **S3**, **S4** festékek szintézisét terveztem elvégezni.



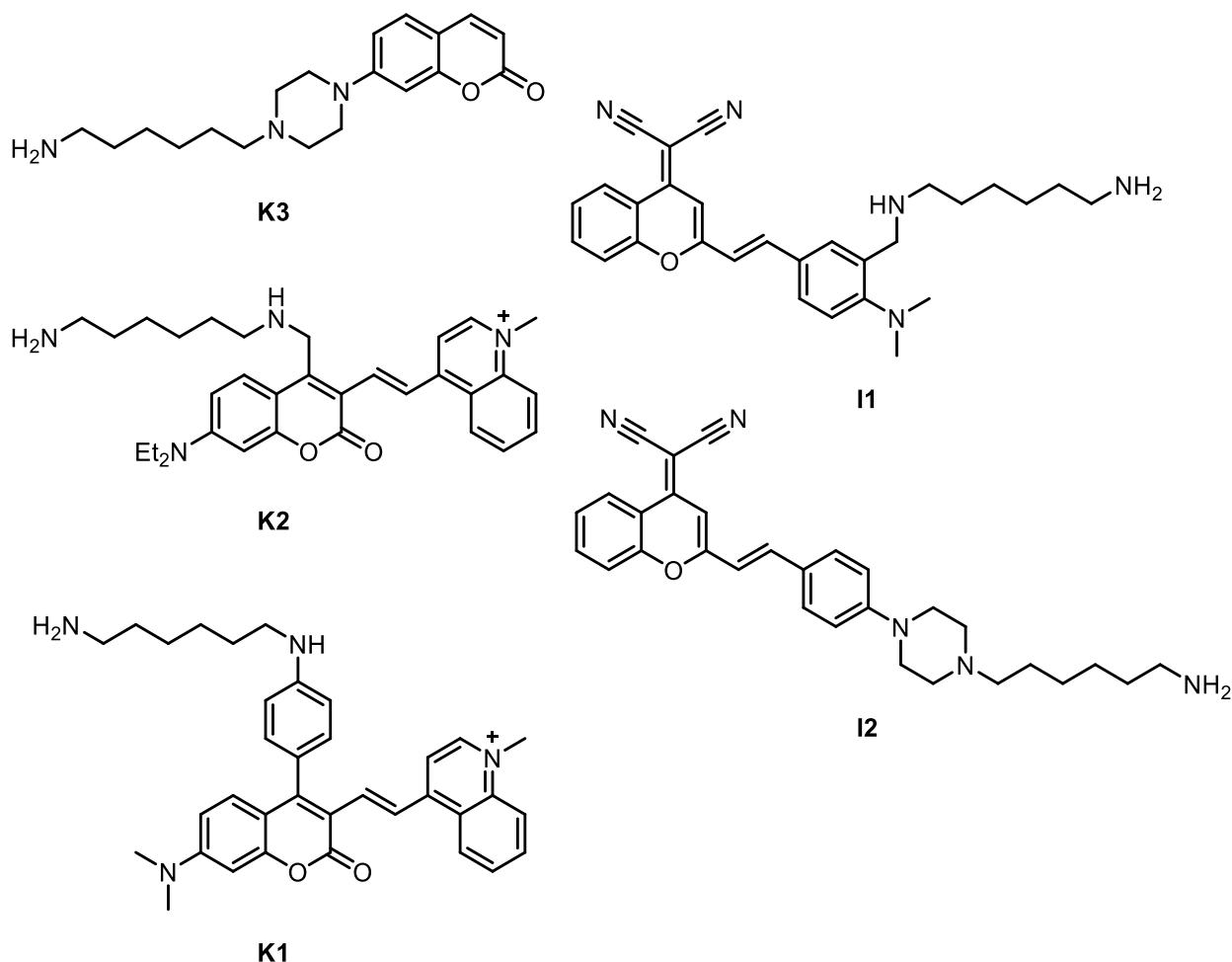
**12. ábra.** A tervezett pillérarének módosítása



**13. ábra.** A komplexképzés tesztelésére tervezett festékmolekulák.

Bár **S1** irodalmi adatai alapján alkalmas lehet komplexképzés által kiváltott blinkingre, szerettem volna olyan festékeket is előállítani, melyeknél nagyobb lehet a komplexálás során bekövetkező intenzitásnövekedés. Ehhez a **K1**, **K2**, **K3** kumarinszármazékok és az **I1** és **I2** dicianometilént tartalmazó festékek szintézisét tűztem ki célul. Ezek olyan festékvázak módosított változatai, amelyeknek fluoreszcens tulajdonsága és nagy Stokes-eltolódása az irodalomból már ismert. <sup>20 21</sup> A módosítás minden esetben egy makrociklussal

komplexbizsítésre alkalmas oldalláncot jelent. Az oldalláncot egy olyan csoporton keresztül kell a festékváz  $\pi$ -elektronvázához kötni, amin keresztül PET létrejöhet, pl. metilamin, anilin vagy piperazin.



**14. ábra.** A tervezett nagy Stokes-eltolódású pillárarén-*guest* festékek.

A festékek előállítása után abszorpciós és emissziós mérésekkel terveztem ellenőrizni a pillárarénnel való komplexképzést és a kioltott fluoreszcencia visszanyerését.

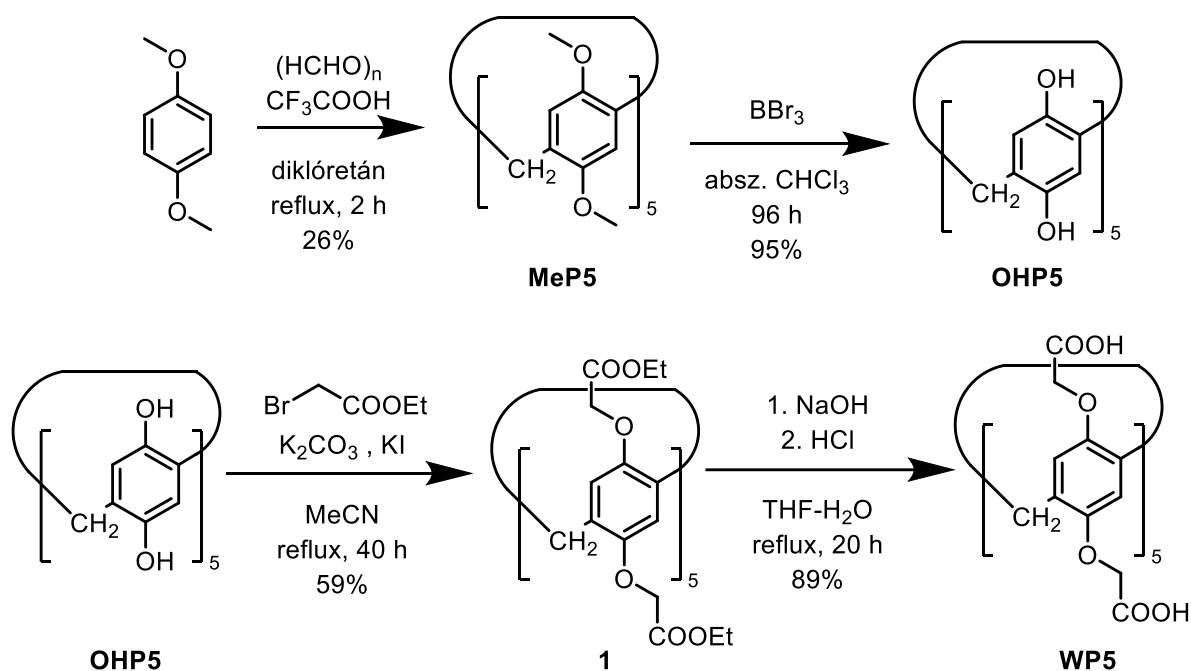
A spektroszkópiás vizsgálatok során biztató eredményeket mutató makrociklus – festék rendszereknek, célul tűztük ki a biológiai környezetben, konfokális fluoreszcens mikroszkóppal való vizsgálatát tetrazinnal módosított fehérjét tartalmazó HEK293 sejteken.

Hosszútávú célom a spektroszkópiai és konfokális mikroszkópiai vizsgálatok alapján ígéretesnek tűnő makrociklus – festék rendszerek kipróbálása SML technikára alkalmas mikroszkóppal.

## 6. Saját munka ismertetése

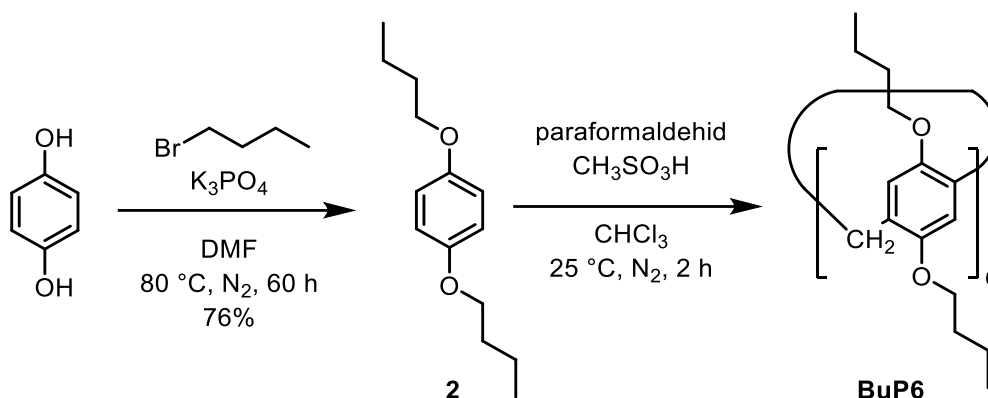
### 6.1. Pillér[n]arén (n=5, 6) makrociklusok szintézise és monofunkcionálása

A hidrokinon származékok makrociklusképző reakcióiban általában az öttagú gyűrűk kialakulásának kedveznek a feltételek. Ezt meg lehet változtatni vagy még jobban eltolni templátmolekulák alkalmazásával. Ezek olyan molekulák, amik már a reakció közben komplexet képeznek a képződő makrociklussal, és meghatározhatják a leggyakoribb termék méretét. A pillér[5]arén esetében az 1,2-diklóretán töltötte be a templát szerepét, a trifluorecetsav pedig katalizátor volt az első lépés során, amikor para-formaldehiden keresztül kapcsoltam össze a monomereket. Második lépés a dekametoxi-pillér[5]arén (**MeP5**) demetilezése, amit  $\text{BBr}_3$ -dal végeztem absz.  $\text{CHCl}_3$ -os oldatban, vízmentes közegben.  $\text{K}_2\text{CO}_3$  bázis jelenlétében  $\beta$ -brómecetsav-etilészterrel alkileztem a hidroxilcsoportokat az **1** termékhez jutva. A utolsó lépésben  $\text{NaOH}$ -dal forralva hidrolizáltam az észterkötéseket, ami után a reakcióelegyet  $\text{HCl}$ -dal savanyítottam meg, így kapva a **WP5** terméket<sup>13</sup> (14. ábra).



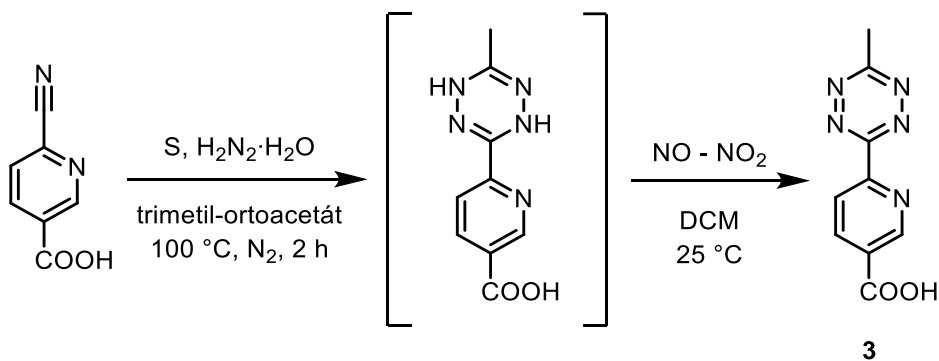
15. ábra. A pillér[5]arén szintézise.

A pillér[6]arén (**WP6**) előállítása az előbbinél valamivel bonyolultabb feladatnak bizonyult, ugyanis a viszonylag egyszerű első alkilező lépés **2** termékével négyféle irodalmi reakció közül csak eggyel tudtam dodekabutoxi-pillér[6]arén (**BuP6**) makrociklust kialakítani, bár ennek a termelése sem közelítette meg a forrásban szereplőt (15. ábra).



16. ábra. A pillér[6]arén szintézise.

A tetrazint 6-cianonikotinsavból kiindulva kétlépéses reakcióban alakítottam ki. A reakciósor első lépésében dihidrotetrazin keletkezik, amit nitrózus gázeleggyel oxidálva jutottam a **4** termékhez (17. ábra).



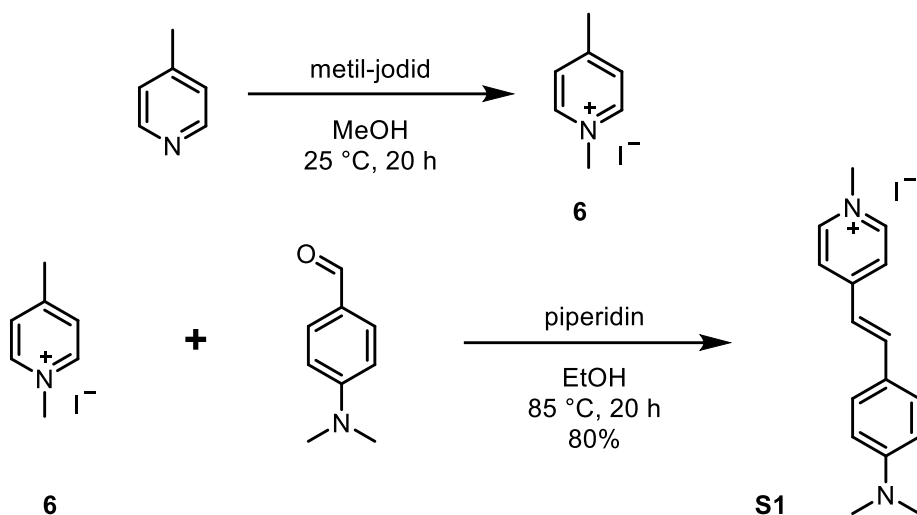
17. ábra. A tetrazingyűrű kialakítása.

A monofunkcionalizálást eddig csak a **WP5**-tel kíséreltem meg. A **3** terméket először NHS-del és EDC·HCl-dal aktív észterré alakítottam, majd *tert*-butil-(6-aminohexil)-karbamáttal reagáltattam. Az így kapott **4** termék *tert*-butoxikarbonil védőcsoportját trifluorecetsavval távolítottam el. 1 ekv. **WP5**-öt 0,75 ekv. **5** termékkel reagáltattam NHS és EDC·HCL jelenlétében szobahőmérsékleten, 20 órán át. A reakció szelektivitása nem jó, csak a **WP5** és **5** arányával lehet befolyásolni, mert a **WP5** 10 – reakció szempontjából egyenrangú – karboxilcsoportot tartalmaz. 0,75 ekv. **5** reagens bizonyult ideálisnak több próbareakció alapján, de a termékek között így is kimutatható mennyiségben keletkezett a **WP5** és **5** 1:2 reakciójával difunkcionált termék. (18. ábra)



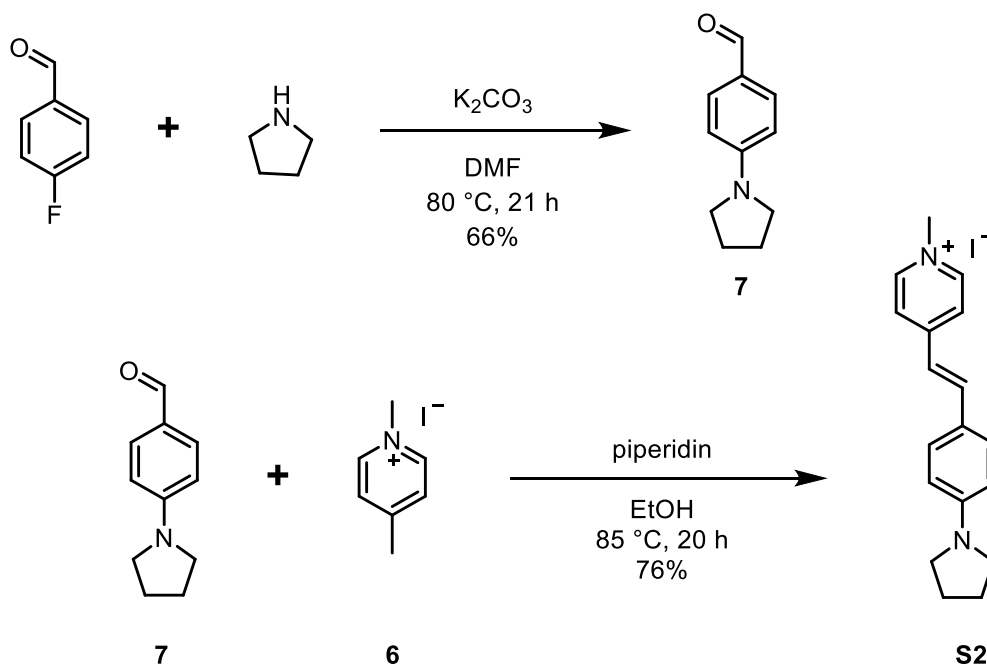
## 6.2. Fluorofór *guest* festékek szintézise

Az **S1** festék előállításához először 4-metilpiridint a nitrogénen metileztem 1,5 ekv. metil-joddal, majd a kvantitatívan keletkezett **6** terméket 4-(dimetilamino)-benzaldehyddel piperidin-katalizált Knoevenagel-kondenzációban kapcsoltam össze. (19. ábra)



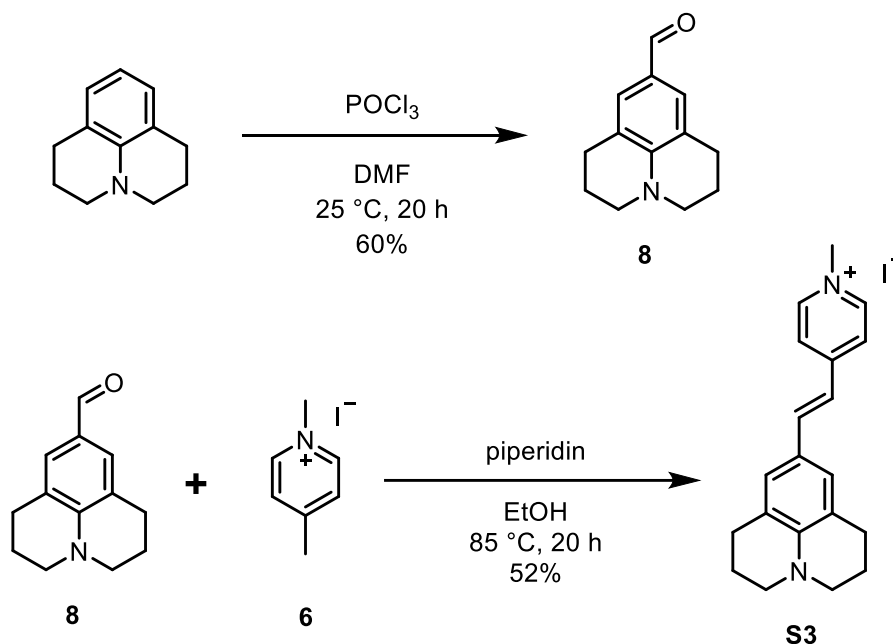
19. ábra. Az **S1** festék szintézise.

Az **S2** festék előállításához 4-fluorbenzaldehydből és pirrolidinből előállítottam a **7** terméket. Ezután a **6** és **7** termékeket az **S1** szintézisével analóg módon reagáltattam. (20. ábra)



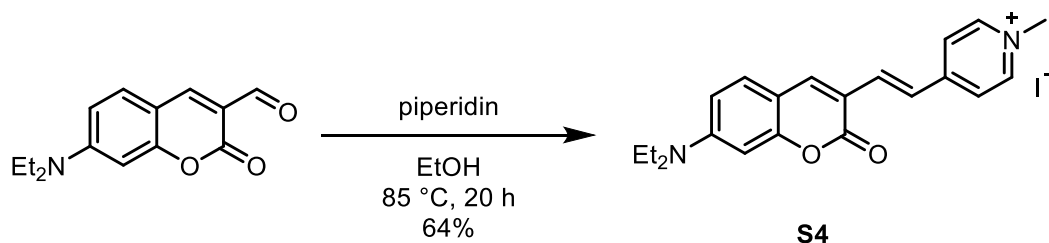
20. ábra. Az **S2** festék szintézise.

**S3** kiindulóanyaga a julolidin, amit először POCl<sub>3</sub>-dal és DMF-dal formileztem, majd az **S1** és **S2** előállításához hasonlóan Knoevenagel-kondenzációval **6** termékkel reagáltattam. (21. ábra)



**21. ábra.** Az **S3** festék szintézise.

Az **S4** festéket a fentiekhez hasonlóan, a kutatócsoportunkban korábban előállított 7-(diethylamino)-2-oxo-2*H*-kromén-3-karbaldehyd és **6** termékből állítottam elő. (22. ábra)

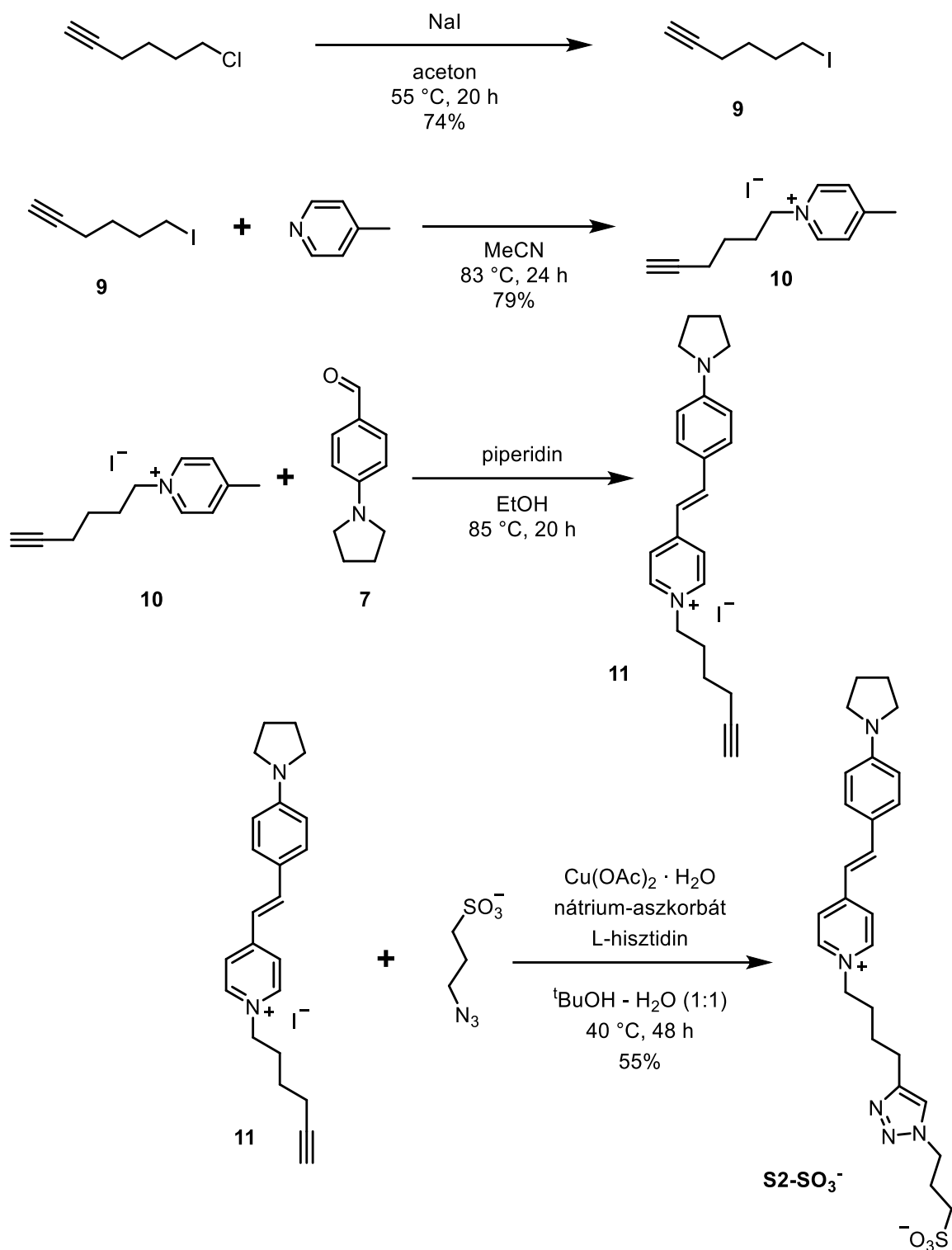


**22. ábra.** Az **S4** festék szintézise.

A mikroszkópos vizsgálatok tapasztalatai alapján (6.3 fejezet) felmerült az igény az ideális festék membrán impermeábilissá tételére, amit az **S2** terméken próbáltam ki, kétféle módosítással: az aromás nitrogénhez vagy rövid alkilláncon keresztül szulfonátcsoportot vagy egy 19 tagú polietilén-glikol láncot kapcsolva. Előbbinél feltételezhető, hogy a negatív töltése, utóbbinál a polimer lánc mérete akadályozza meg a molekula bejutását a sejtmembránon.

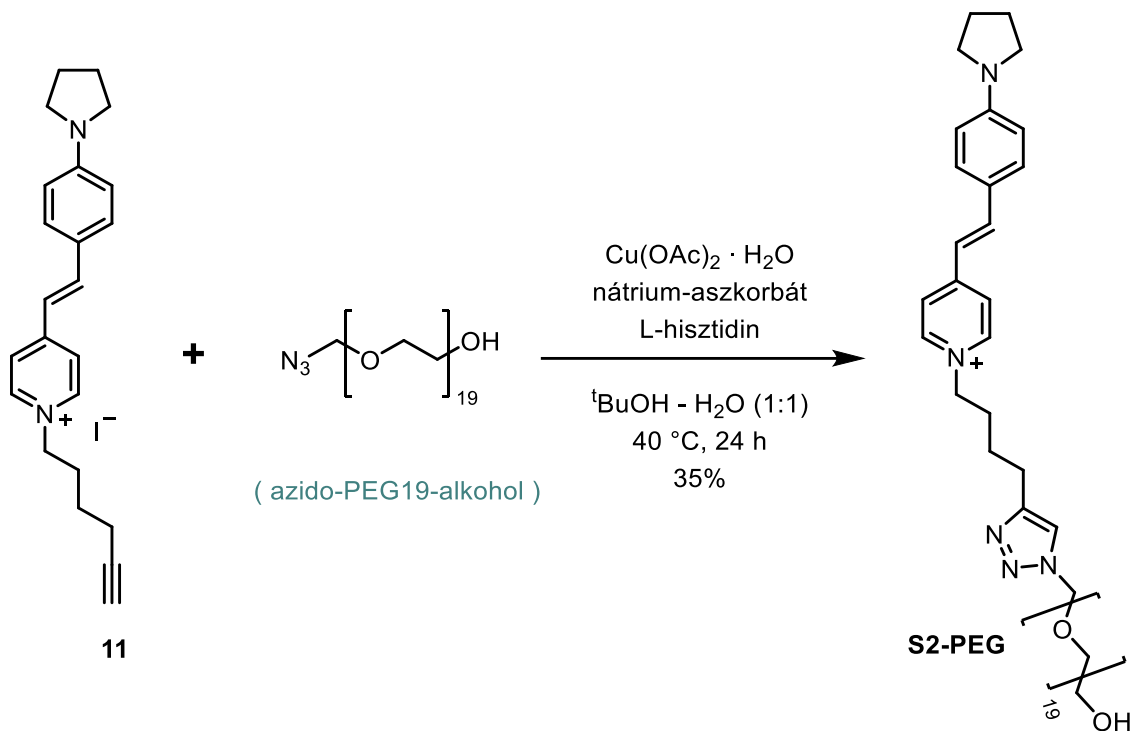
A szulfonátcsoporttal módosított **S2** vegyület előállításához először 6-klórhex-1-in klóratomját cseréltem jódra NaI-dal (Finkelstein-reakció), majd az így nyert **9** termékkel 4-metilpiridint alkileztem a nitrogén atomon. A kapott **10** terméket az **S2** előállításával azonos

módon reagáltattam **7** közttermékkel, majd az ebből keletkező **11** köztterméket réz(I)-katalizált azid-alkin klikk-reakcióval 3-azidopropán-1-szulfonáthoz kapcsoltam, így kapva a tervezett **S2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>** festéket. (23. ábra)



23. ábra. Az **S2**-a festék szintézise.

A polietilén-glikol láncsal módosított **S2-PEG** festéket **S2- SO<sub>3</sub><sup>-</sup>** előállításával analóg módon a **11** termék és azido-PEG19-alkohol azid-alkin reakciójából nyertem. (24. ábra)

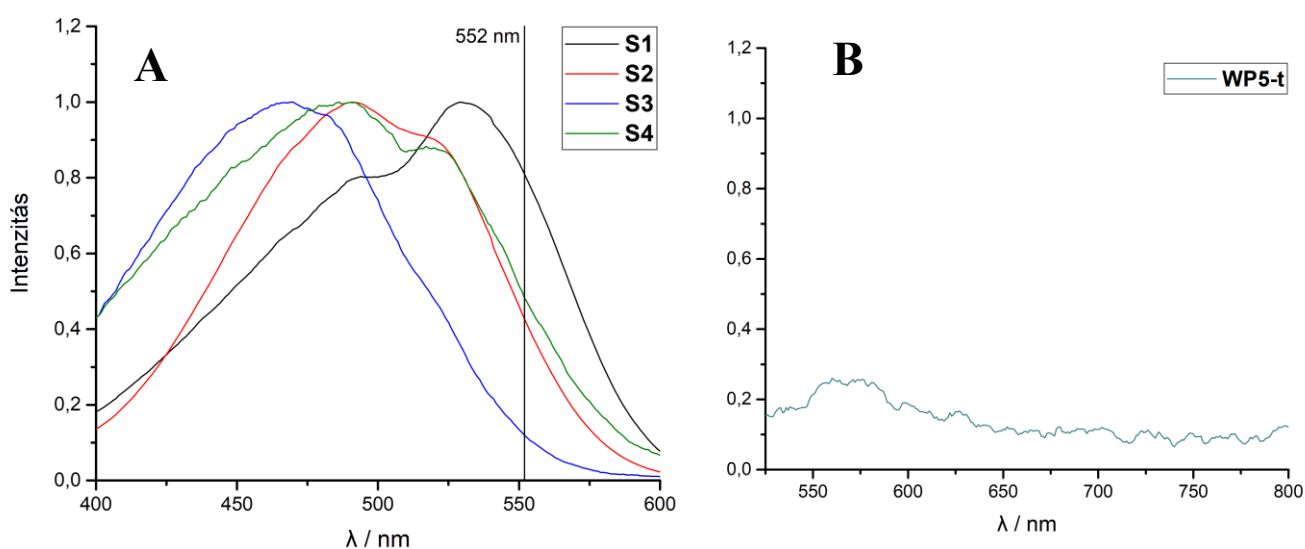


**24. ábra.** Az **S2-PEG** festék szintézise.

### 6.3. Pillér[5]arén – fluorofór szupramolekuláris rendszerek vizsgálata

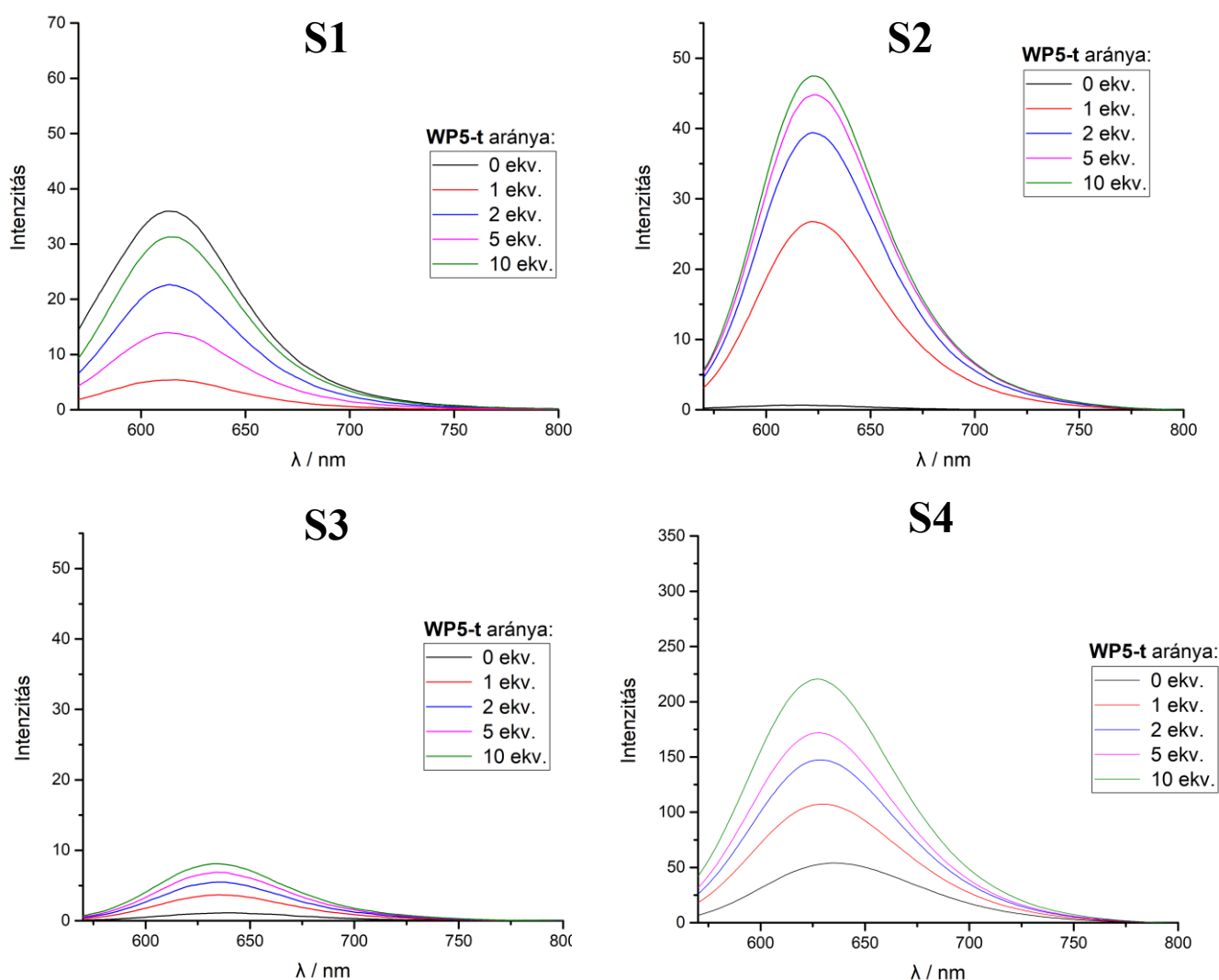
A **WP5-t** – festék komplexképzését elsősorban azonos festékkoncentrációjú, de különböző pillér[5]arén koncentrációjú PBS-oldatok fluoreszcens emisszió és abszorpció mérésével vizsgáltam. Először minden festék esetében azt ellenőriztem, hogy a **WP5-t**:festék arány növekedésével el lehet-e érni jelentős fluoreszcens intenzitásnövekedést.

Az **S1**, **S2**, **S3**, **S4** festékek fluoreszcens gerjesztési spektruma és a rendelkezésre álló mikroszkóp gerjesztő lézereinek hullámhossza alapján az intenzitásnövekedést 552 nm-en gerjesztve mértem. Ugyanezen a hullámhossztartományon kontrollként felvettem a **WP5-t** gerjesztési spektrumát is. (25. ábra)  $\lambda$



**25. ábra.** Az **S1**, **S2**, **S3**, **S4** festékek (A) és a **WP5-t** fluoreszcens gerjesztési spektruma (B) (5  $\mu$ M koncentráció PBS-oldatban, 632 nm-en detektálva).

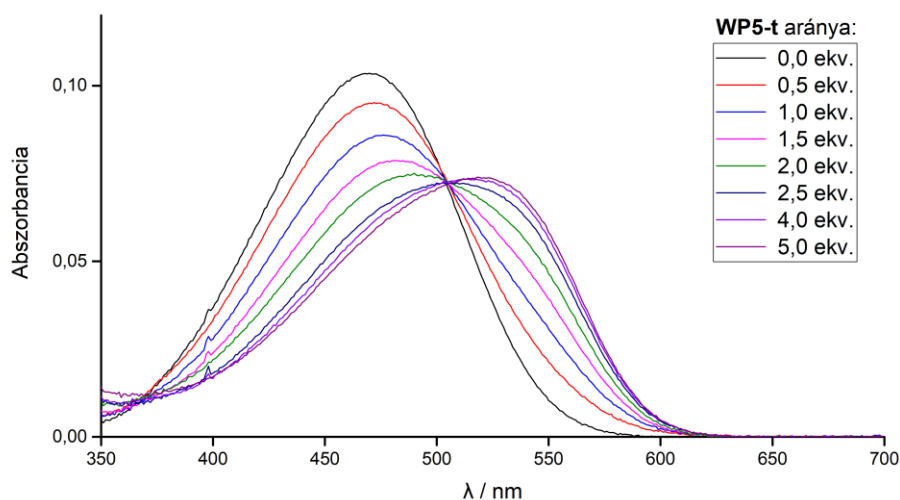
A legnagyobb intenzitásnövekedés **S2** esetében volt megfigyelhető. **S1** komplexált formájának emissziója szintén hatékonyan visszanyert fluoreszcens tulajdonságra utal, míg **S3** és **S4** esetében a komplexált és a szabad forma közötti különbség kicsi. (26. ábra)



**26. ábra.** Az S1, S2, S3, S4 festékek emissziós spektrumai  
(5  $\mu$ M festék PBS-oldatban, 552 nm-en gerjesztve).

A vizsgálatot csak **S2** festékkal folytattam a fenti eredmény alapján. Az abszorpciómérést egy állandó festékkoncentrációjú, változó **WP5-t**-koncentrációjú PBS oldatsorozaton végeztem.

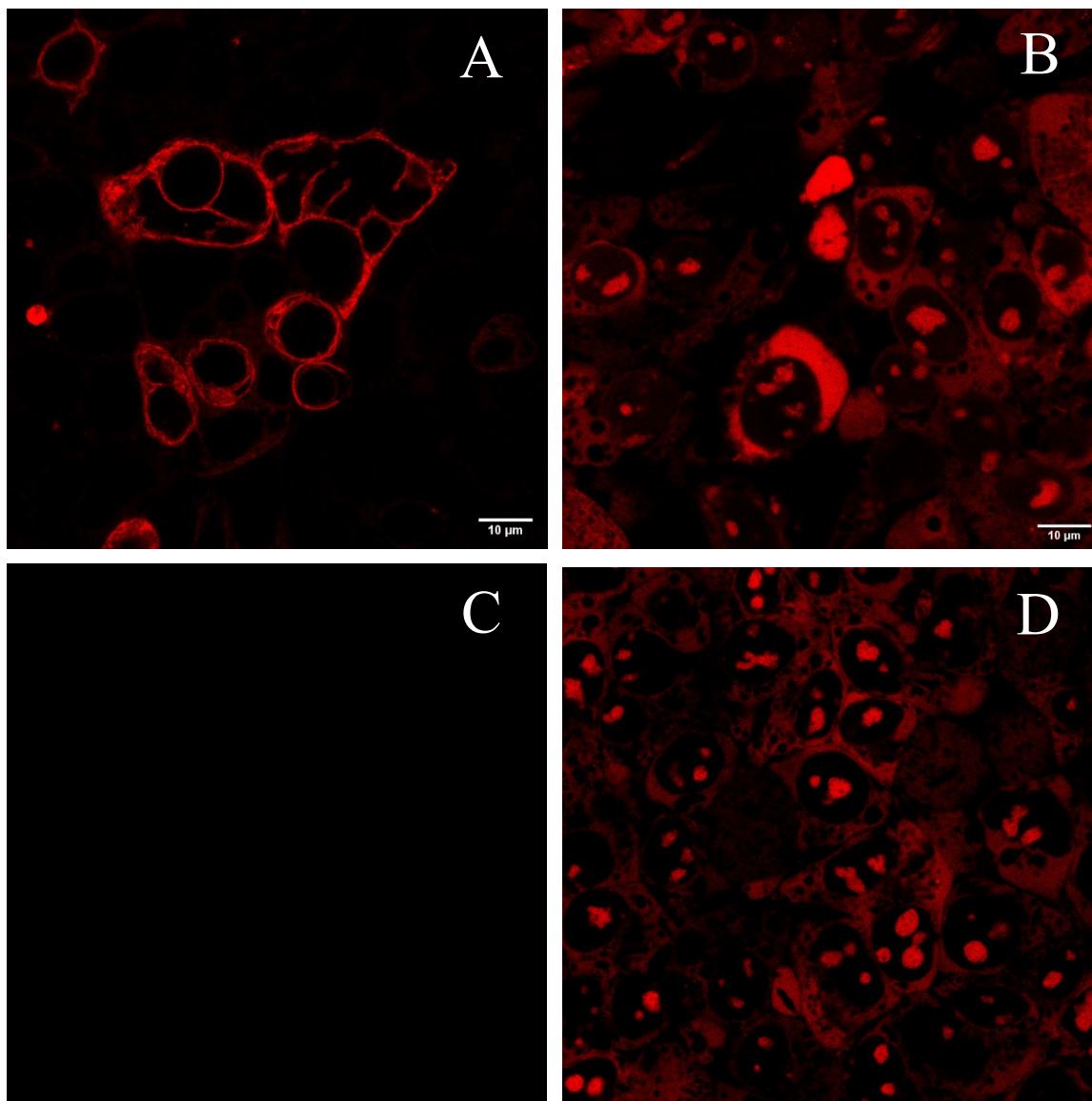
A komplexképzéssel az abszorpció csökkenése és az elnyelés maximumának eltolódása figyelhető meg, ami összhangban van az hasonló pillérarén – festék komplexek irodalmi mérésivel.<sup>22</sup> (27. ábra)



**27. ábra.** S2 abszorpcióváltozása a WP5-t-koncentráció növekedésével.

(5  $\mu$ M S2 PBS-oldatban, a 7. és 9. mérést kiugrónak tekintve)

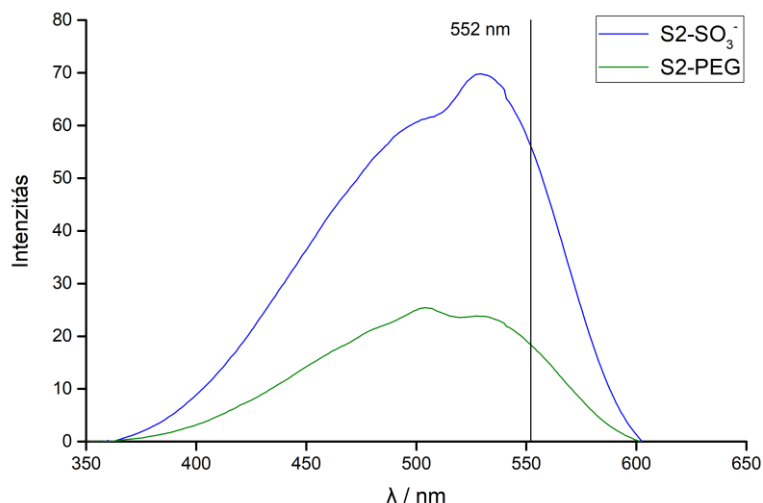
Mivel S2 a spektroszkópiai mérések alapján megfelelt a festékekkel szembeni elvárásainknak, célul tűztük ki a biológiai környezetben, konfokális fluoreszcens mikroszkóppal való vizsgálatát. Ehhez HEK293T sejteket választottunk, amelyekben a genetikai kód kiterjesztésének módszerével (GCE) <sup>23</sup>, 1,2,4,5-tetrazinnal bioortogonális reakcióra alkalmas biciklononin (BCN) csoportot tartalmazó nem természetes aminosavat építettünk inzulinreceptor extracelluláris régiójába. E célból egy, a TAG stop kodont a BCN-lizin beépülésének megfelelő helyen tartalmazó módosított inzulinreceptor génjét kódoló plazmidot, valamint a genetikai kód kiterjesztéséhez szükséges aminoacil-tRNS szintetáz és specifikus tRNS génjét kódoló expressziós plazmidokat juttatunk a modellsejtekbe. Ez a módosított receptorfehérje a sejtmembránba épül, lehetővé téve, hogy a sejten kívülről a WP5-t kötődhessen hozzá. Ezeket a sejteket fixálva, a festéket feleslegben alkalmazva (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M koncentrációkban) konfokális fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Ideális esetben a sikeresen transzfektált sejtek membránjain figyelhetnénk meg a háttérnél sokkal intenzívebb jelölődést. Pozitív kontrollként olyan festéket használtunk, mely szintén specifikusan képes kötődni az általunk expresszált fehérjéhez így alkalmas a jelölés összehasonlítására.



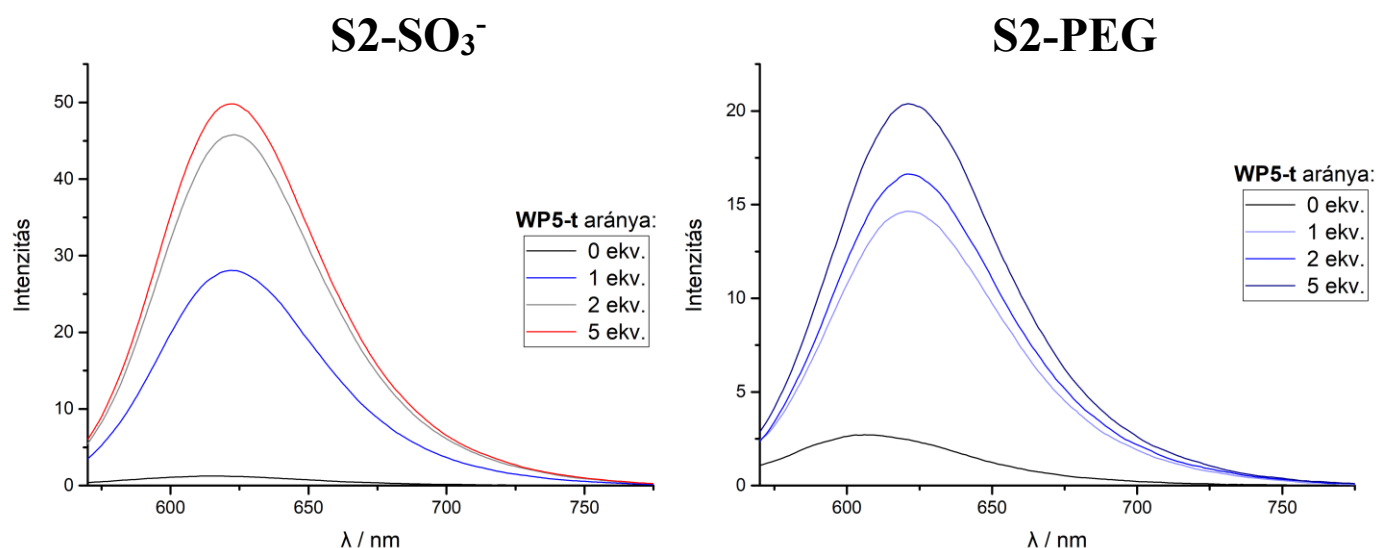
**28. ábra.** A kontroll festéssel jelölt transzfektált sejtek (A);  
a transzfektált **WP5-t**-vel jelölt (3  $\mu$ M) sejtek 3  $\mu$ M **S2**-oldatban (B);  
nem transzfektált sejtek (negatív kontroll) (C);  
nem transzfektált sejtek 3  $\mu$ M **S2**-oldatban (D)

A mikroszkópos képek alapján arra lehet következtetni, hogy **S2** bejut a sejtekbe, ahol bizonyos sejtalkotókban feldúsul, ez pedig nem teszi lehetővé, hogy **WP5-t** - **S2** komplexek jelenlétét figyeljük meg a sejtmembránokon. (28. ábra)

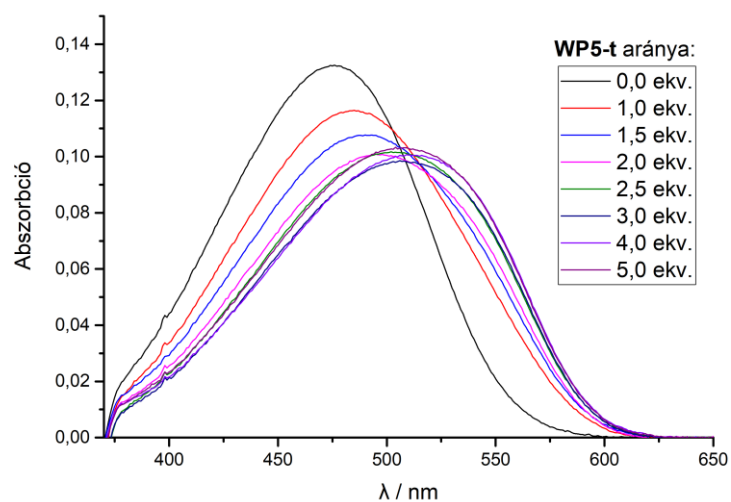
A fenti eredmények alapján előállítottam **S2** származékait: **S2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>** és **S2-PEG** festékeket, melyek a módosítások miatt várhatóan nem képesek behatolni a sejtekbe (6.2 fejezet). A többi festékhez hasonlóan mértem a fluoreszcens emissziójuk változását komplexképzéskor. (30. ábra) Mivel csak **S2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>** mutatott **S2** festékéhez hasonló intenzitásnövekedést, csak erről vettem fel abszorpciós spektrumot. (31 ábra)



**29. ábra.** Az **S2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>** és **S2-PEG** festékek gerjesztési spektruma (5 μM koncentráció PBS-oldatban, 632 nm-en detektálva).



**30. ábra.** Az **S2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>** és **S2-PEG** festékek emissziós spektrumai (5 μM festék PBS-oldatban, 552 nm-en gerjesztve).

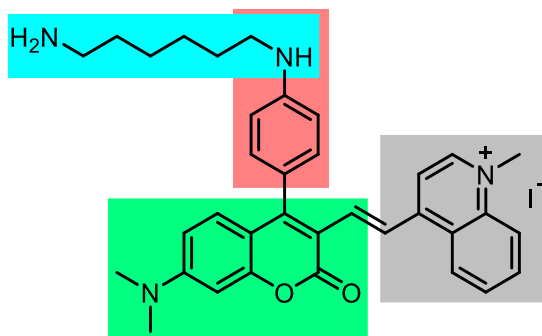


**31. ábra.** S2- SO<sub>3</sub><sup>-</sup> abszorpcióváltozása a WP5-t-koncentráció növekedésével.  
(5 μM S2- SO<sub>3</sub><sup>-</sup> PBS-oldatban)

A spektroszkópai mérések alapján az S2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> mikroszkópos vizsgálatát is célul tűztük ki, de erre a dolgozat megírásáig nem került sor.

## 6.4. Nagy Stokes eltolódású fluorofór festékek szintézise

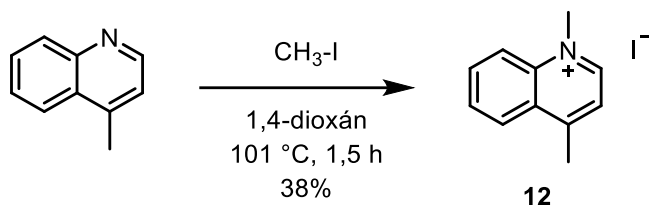
A **K1** festék szintézisét négy modul összekapcsolásával terveztem végrehajtani (32. ábra). A lepidínium (szürke) a kumarin (zöld)  $\pi$ -elektronrendszerének kiterjesztésére szolgál, ezzel a vörös tartomány felé lehet eltolni a gerjesztési és emissziós maximumokat. A WP-vel való komplexképzéshez hexándiamin (kék) beépítését terveztem. A fluoreszcencia kioltásához szükséges anilin kialakítása a fenilcsoport (piros) beépítésén át lehetséges.



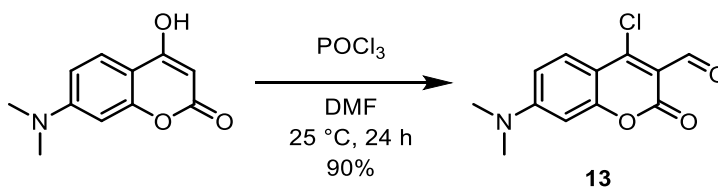
32. ábra. Az **K3** festék négy modulja.

Először a célvegyületet alkotó építőelemeket állítottam elő.

A metil-lepidínium (**12**) modult lepidin metil-jodidos metilezésével állítottam elő (33. ábra).



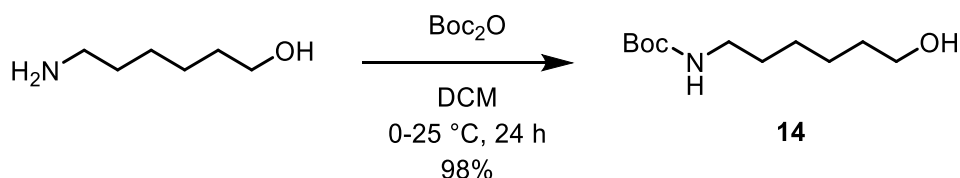
34. ábra. A lepidínium előállítása.



33. ábra. A keresztkapcsolható kumarin szintézise.

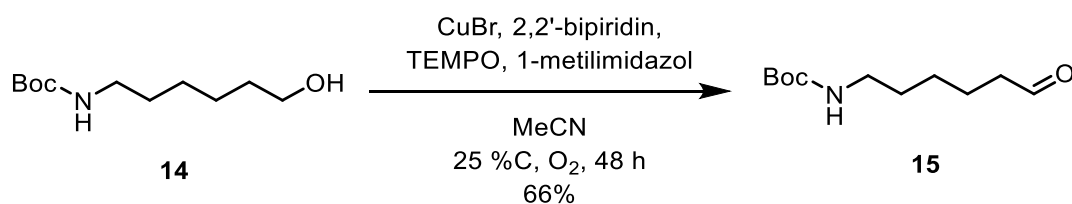
A 3-as és 4-es helyzetben is továbbépíthető kumarin-származékot 7-dimetilamino-4-hidroxi-kumarinból kiindulva állítottam elő, melyet Vilsmeier-Haack reakcióban formileztem, amivel egyszerre a 4-hidroxilcsoport klórra cserélődik (35. ábra).

A komplexáló-modul kialakításához először *tert*-butil-oxikarbonil (Boc) védőcsoporttal láttam el a primer-amint (34. ábra).



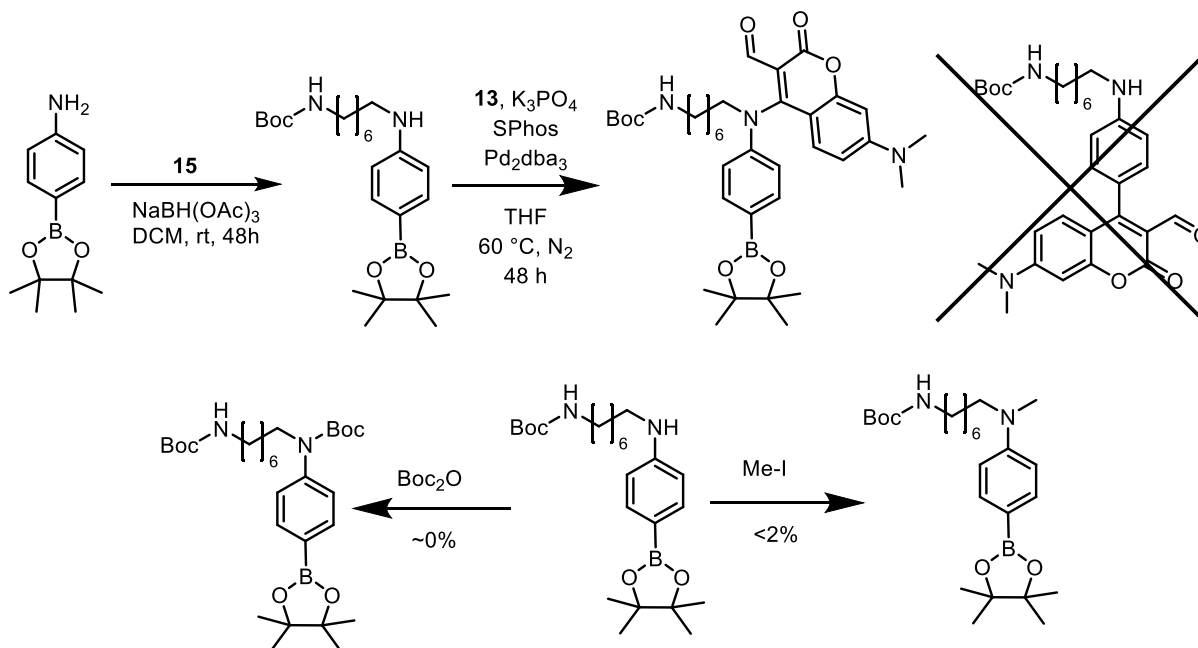
**34. ábra.** A primer-amin Boc-védése.

Ezután katalitikus oxidációval aldehiddé alakítottam a lánc másik végének alkoholsoportját, hogy később az anilin aminosoportját redukzív alkilezéssel kapcsolhassam a lánchoz (35. ábra).



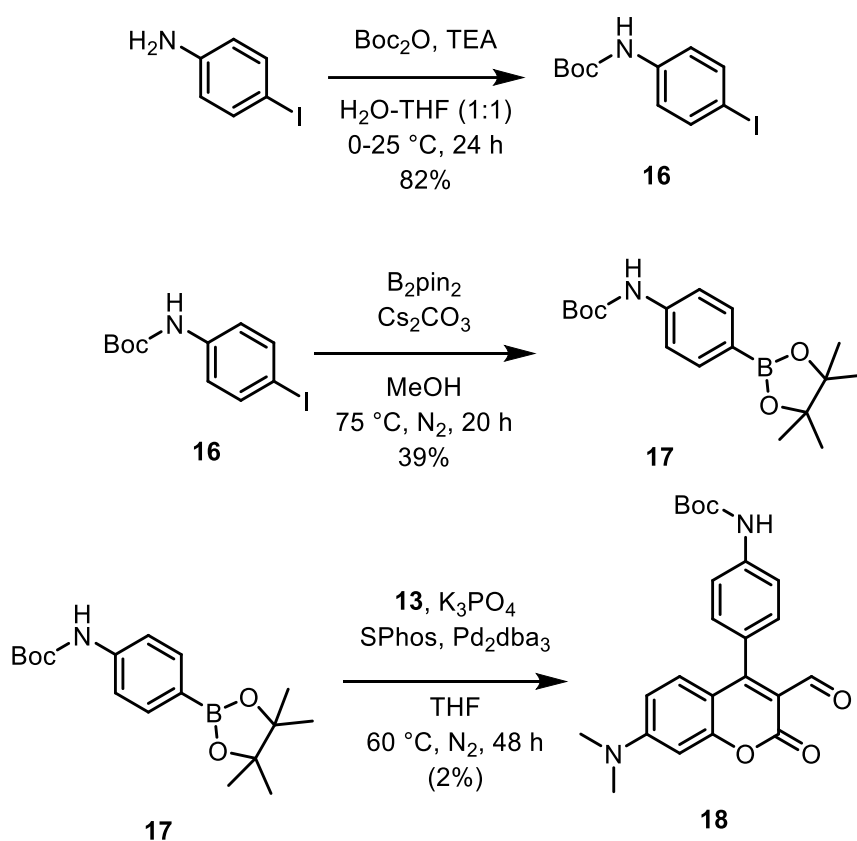
**35. ábra.** A **14** termék katalitikus oxidációja.

Az első próbálkozásnál a **15** oldalláncot kapcsoltam először a fenilén linkerre, majd a kapott terméket **13** 4-klórkumarinnal reagáltattam, de ez nemkívánatos mellékreakciókhoz vezetett. Suzuki-reakció helyett nukleofil szubsztitúciós reakció játszódott le a kumarin 4-es helyzetében a boronátészter származék szekunder aminosoprtjával. Ezt először a láncközi szekunder-amin védésével (metilezés és Boc-védés) próbáltam megelőzni, de a védett termékeket csak nagyon rossz termeléssel tudtam előállítani (36. ábra).

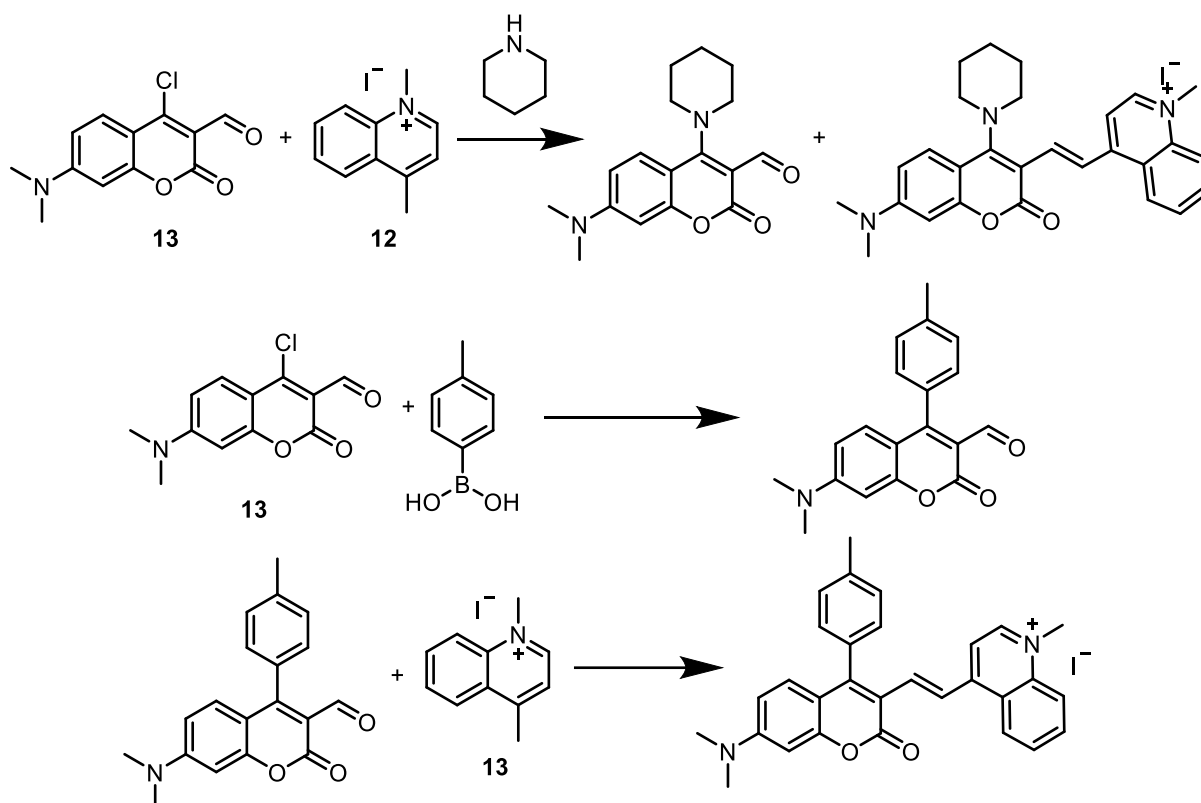


**36. ábra.** A sikertelen Suzuki-reakció és a kiinduló anyag védésére tett kísérletek.

Ezek után más sorrendben próbáltam meg az egységek összekapcsolását. Először az aminofenil egységet **13** kumarinhoz, majd a kapott termékre a **15** oldalláncot próbáltam kapcsolni (végül ez bizonyult a jó sorrendnek). Ehhez 4-jódanilint védtem Boc-csoporttal, majd a jódot pinakolboronátra cseréltem le a 4-es helyzetben. Következő lépésként a **13** kumarin és **17** boronát Suzuki-keresztkapcsolásával próbálkoztam (37. ábra). Bár ez a reakció nagyon rossz termeléssel játszódott le, valószínűleg a tisztítási módszer finomítása vagy elhagyása és a reakciókörülmények optimalizálása megoldja majd a problémát, erre viszont a dolgozat megírásáig nem volt időm.



**37. ábra.** Az **18** termék előállítása 4-jódanilinből, és kapcsolása **13** kumarinnal.

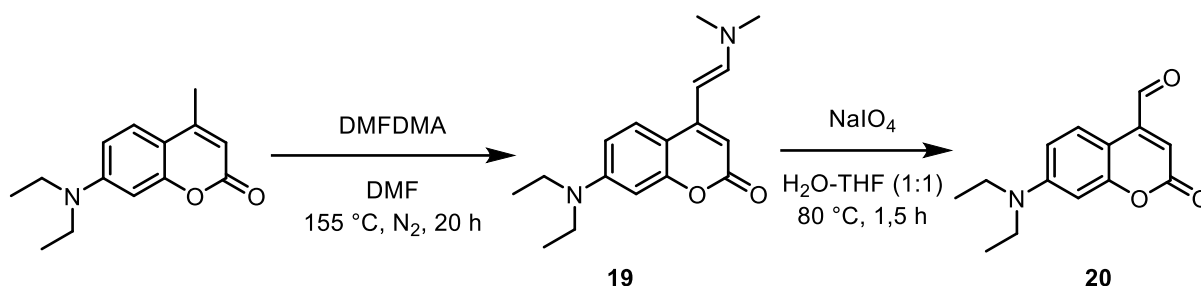


**38. ábra.** A kumarin és a lepidínium összekapcsolásának kísérletei.

Az **12** lepidínium és a kumarin-3-karbaldehyd reakciójával kapcsolatban is végeztem próbareakciókat (38. ábra). Először a **13** kumarinnal reagáltattam a **12** lepidíniumot, de ekkor nem a várt termék keletkezését tapasztaltam, mert a reakcióban jelen lévő piperidin nem kívánt reakcióba lép a 4-es helyzetű klóratommal. Egy modellvegyületet is előállítottam **13** kumarin és toлил-boronsav Suzuki-kapcsolásával, melyen a lepidínium kapcsolása is sikeres volt. Ezekből következik, hogy a váz kiterjesztését a lepidinnel a szintézissor végére kell hagyni, de legalábbis a keresztkapcsolás utánra.

A **K2** festéket elsősorban tartalék lehetőségnek szántuk arra az esetre, ha a **K1** festék keresztkapcsolási termékét nem sikerül elfogadható mennyiségben kinyerni. Itt az aminofenil összekötő csoport helyett metilén linkert terveztünk a molekulába, amivel a jó alapvázból kiindulva el lehet kerülni a keresztkapcsolást és a fluoreszcencia kioltása ezen keresztül is működhet. (A **K1** festékből ilyen alapanyag nem állt rendelkezésre.)

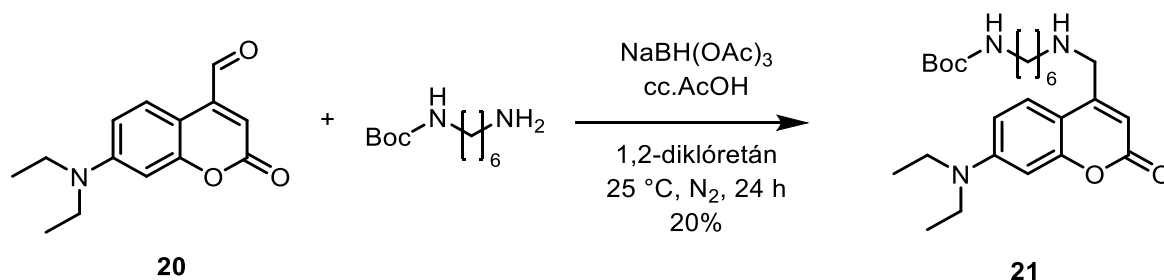
Az alapváz kialakításakor először 7-dietilamin-4-metilkumarint *N,N*-dimetilformamid-dimetil-acetáttal reagáltatva a **19** terméket kaptam, majd ezt tisztítás nélkül NaIO<sub>4</sub>-al oxidáltam a **20** terméké (39. ábra).



**39. ábra.** Az aldehid kialakítása a 4-es helyzetű metilcsoporton.

Ebből az alapanyagból csak a 7-dietilamino-szubsztituált állt rendelkezésre az **K1** festék 7-dimetilamino-szubsztituált vázához képest, de ez valószínűleg nem befolyásolja a **K2** fotokémiai tulajdonságait.

A komplexálódásra képes láncot ennél a molekulánál is redukzív alkilezéssel kapcsoltam az összekötő csoporthoz (40. ábra).



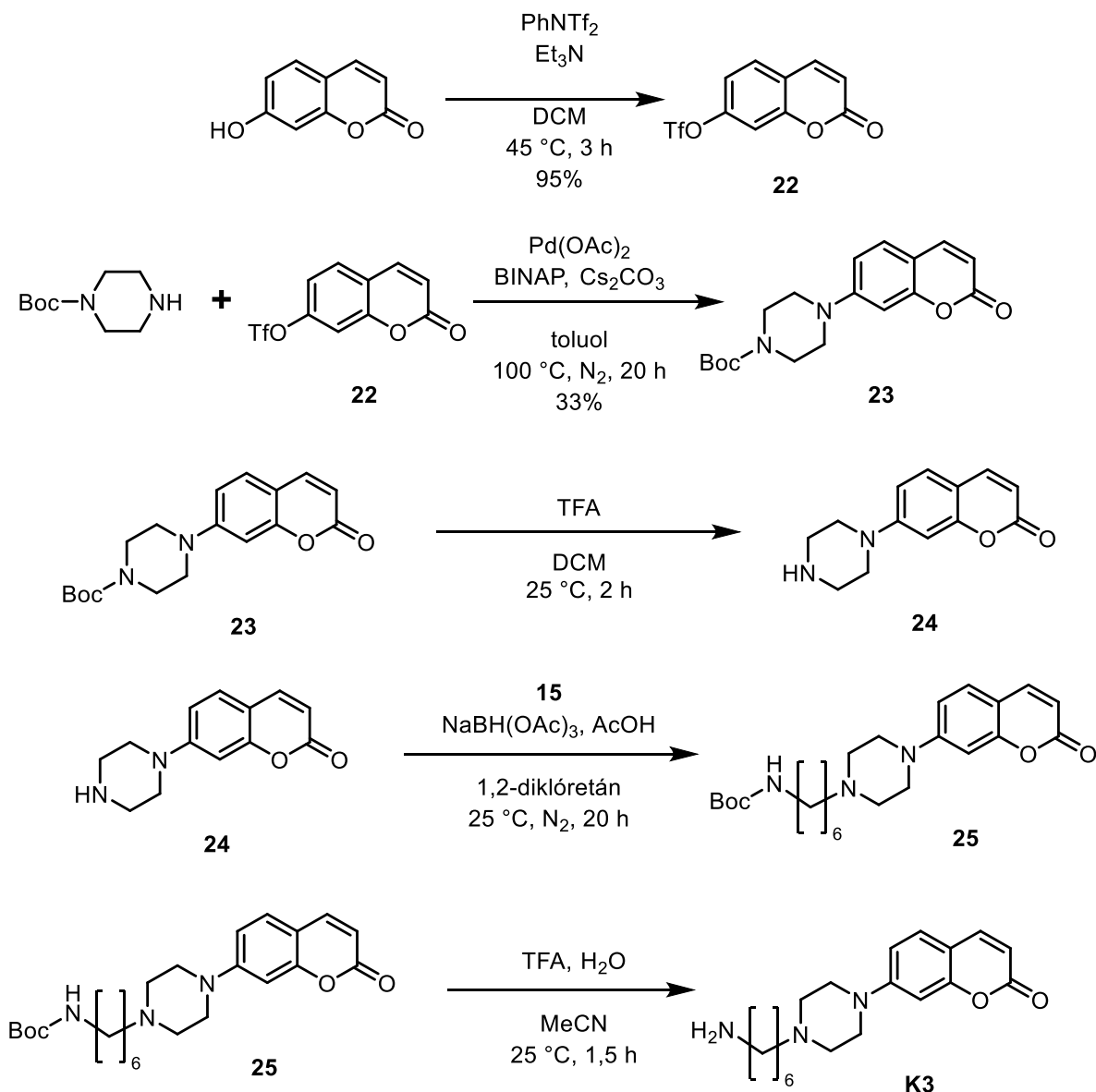
**40. ábra.** A **20** kumarin és a diaminoheptán lánc összekapcsolása.

A terv szerint ezt követően POCl<sub>3</sub>-al formileztem volna 3-as helyzetben a **21** terméket, majd **12** lepidíniumot kapcsoltam volna hozzá, de erre még eddig nem jutott idő.

A fentiekkel párhuzamosan egy olyan kumarin alapú festéket is előállítottam, amin a komplexálódó oldalláncot egy piperazin részen keresztül kötöttem a kromén alapvázhhoz 7-es helyzetben (**K3**). Ezzel a molekulával annak az eldöntése volt a cél, képes-e az oldallánc piperazinon keresztül is hatékonyan kioltani PET-tel a festékváz fluoreszcenciáját, hiszen ez egy sokkal könnyebben előállítható alternatívája lehetne **K1** és **K2**-nek.

A **K3** termék előállításához 7-hidroxi-2*H*-kromén-2-on hidroxilcsoportjához bisz-(trifluorometánszulfuril)-anilinnel (PhNTf<sub>2</sub>) reagáltatva triflátsoportot kapcsoltam (**22**), majd ezt a következő lépésben *tert*-butil-piperazin-1-karboxiláttal Boc-csoporttal védett piperazinra cseréltem Buchwald-Hartwig reakcióban (**23**). A védőcsoportot trifluoecetsavval távolítottam el (**24**) és a helyére redukatív aminálással kötöttem a **15** terméket (**25**). Az oldallánc

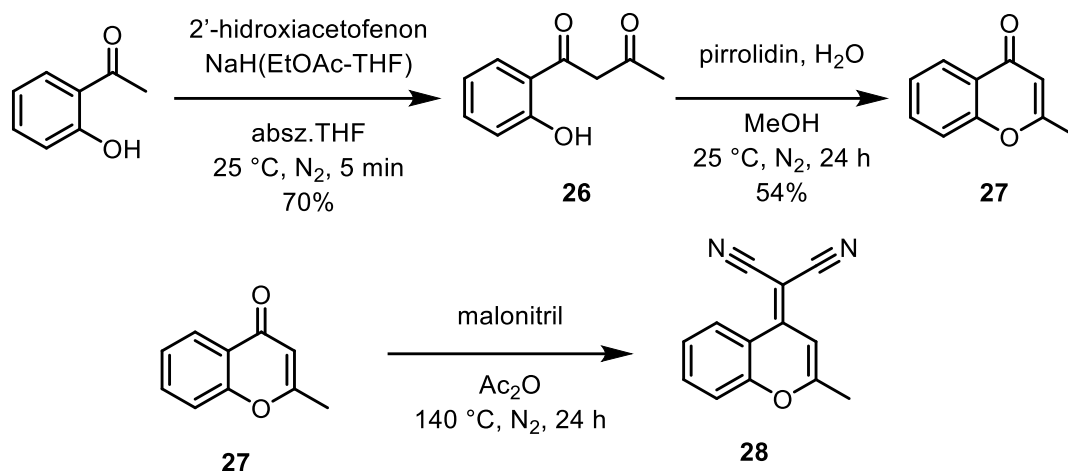
Boc-védőcsoportját szintén trifluorecetsavval távolítottam el, így kaptam a **K3** festéket. (41. ábra)



41. ábra. **K3** szintézise.

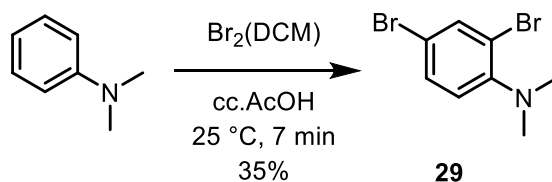
Az **I1** festék egy előzőktől eltérő szerkezetű nagy Stokes-eltolódású fluorogén vegyület. Ennek a szintézisét arra az esetre készülve kezdtem el, ha a kromén alapvázú **K1** és **K2** festékek előre nem látható szerkezeti okból nem felelnének meg az elvárásainknak. (Módosítható nagy Stokes-eltolódású alapvázakból keveset ismerünk.)

A festék dicianometilén-kromén egységének kialakításához először Claisen-reakcióval 2-hidroxi-acetofenont a **26** terméké alakítottam, azt pedig pirrolidin- és vízkatalizált gyűrűzúródási reakcióval **27** kromonná. Az oxocsoportot ecetsav-anhidrid közegében, magas hőmérsékleten malonitrilre cseréltem (42. ábra).



**42. ábra.** A **28** termék szintézise.

Az egyszeres gyűrű kialakításában csak az első, dibrómozás lépésig jutottam (43. ábra).

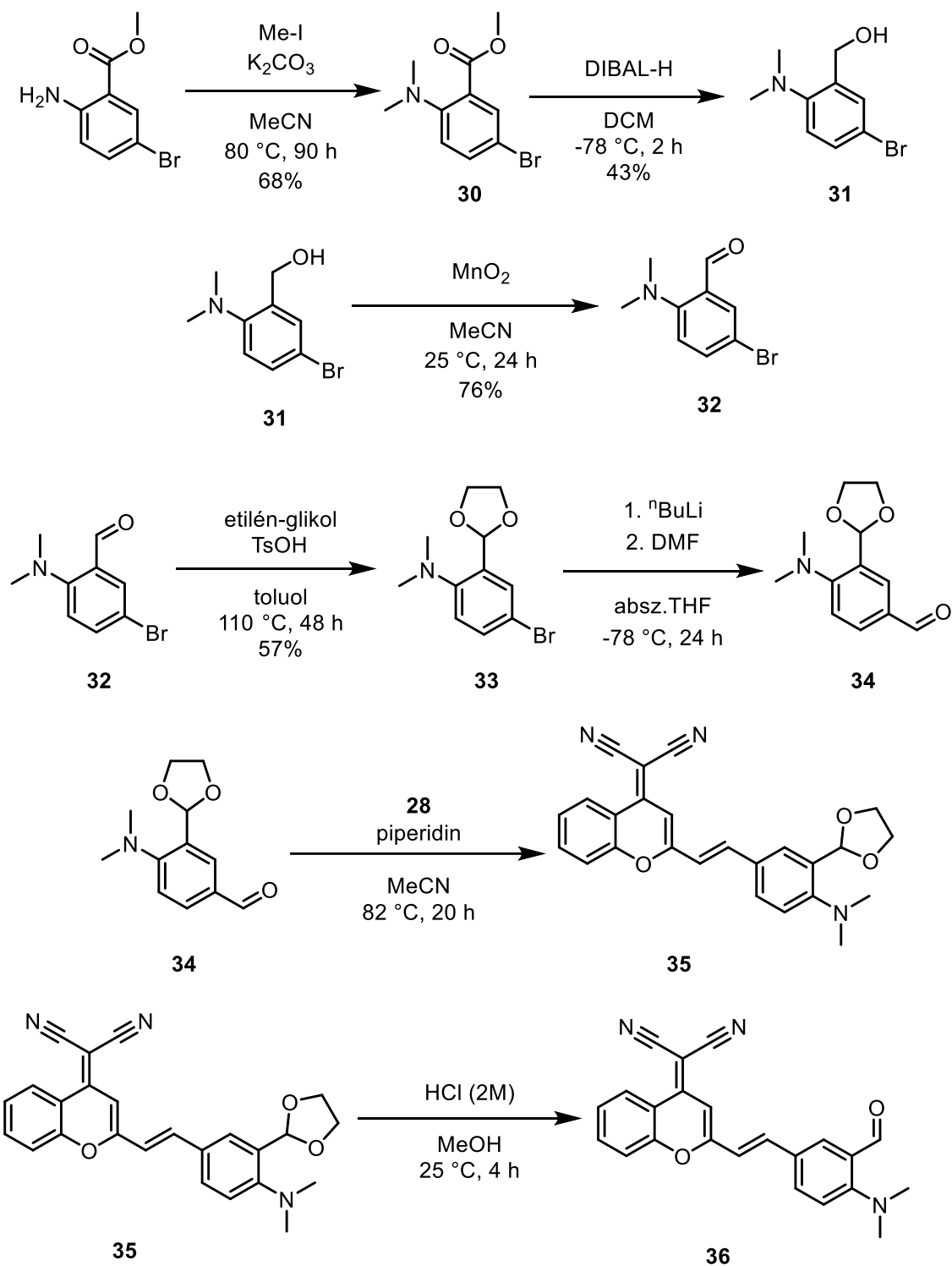


**43. ábra.** A **29** termék szintézise.

A **29** terméken ezek után az orto-helyzetű brómatomot kell szelektíven oxocsoportra cserélni, ami nehéz feladat, mivel a legtöbb hőmérsékleten (-90 °C fölött) nem szelektív a reakció. A brómatomok egyenkénti aldehidre cserélése és az dimetilamin csoportra orto-helyzetű formilcsoport acetállá alakítása után kerülhet sor a gyűrűk összekötésére, majd az addig védett oxigénen keresztül az alkilánc kötésére.

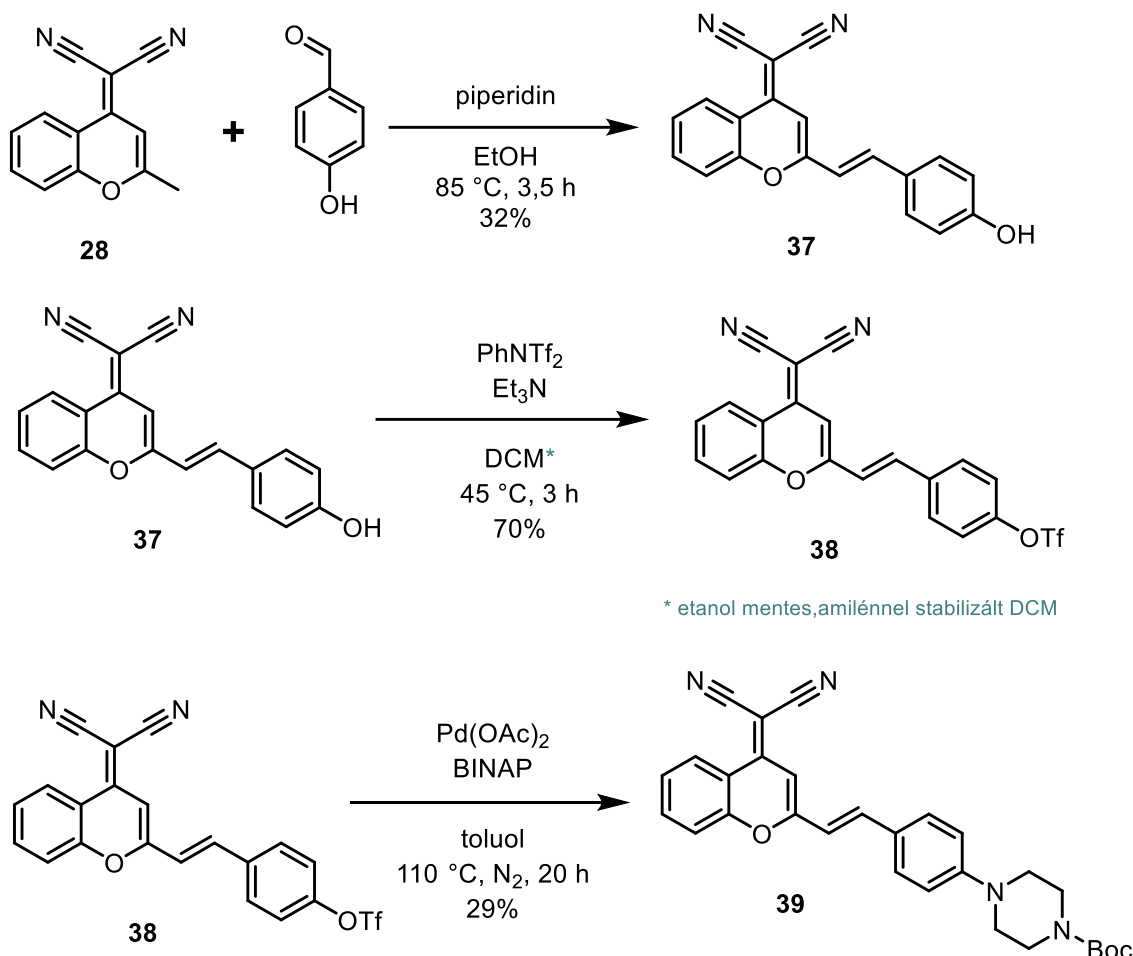
A fenti módszer helyett egy valamivel hosszabb, de egyszerűbben kivitelezhető reakcióutat terveztem. Itt metil-2-amino-5-brómbenzoátból indultam ki. Első lépésben metil-jodiddal dimetileztem az aminocsoportot (**30**), majd az észtercsoportot diizobutil-alumínium-hidriddel (DIBAL-H) redukáltam alkohollá (**31**). A hidroxilcsoportot MnO<sub>2</sub>-dal oxidáltam (**32**), az így kapott karbonilcsoportot etilénlikollal acetállá alakítva védtem (**33**). A brómot ez után <sup>t</sup>BuLi-mal és dimetil-formamiddal formilcsoportra cseréltem (**34**). A **34** és **28** közttermékeket piperidin-katalizált Knoevenagel kondenzációval kötöttem össze (**35**). Az acetál védőcsoportot híg sósavval bontottam el (**36**). Ez után a **36** termék karbonilcsoportjához redukatív aminálással kötöttem volna a komplexálódó láncot (*tert*-butil-(6-aminohexil)-karbamát), de ideáig még nem jutottam el, mert a **36** termékből már csak nagyon kis mennyiség maradt a sok lépés

anyagvesztései miatt. Az LC-MS és NMR mérések alapján minden reakcióban nagyrészt a várt termékek keletkeztek, tehát a módszer alkalmasnak tűnik **II** előállítására. (44. ábra)



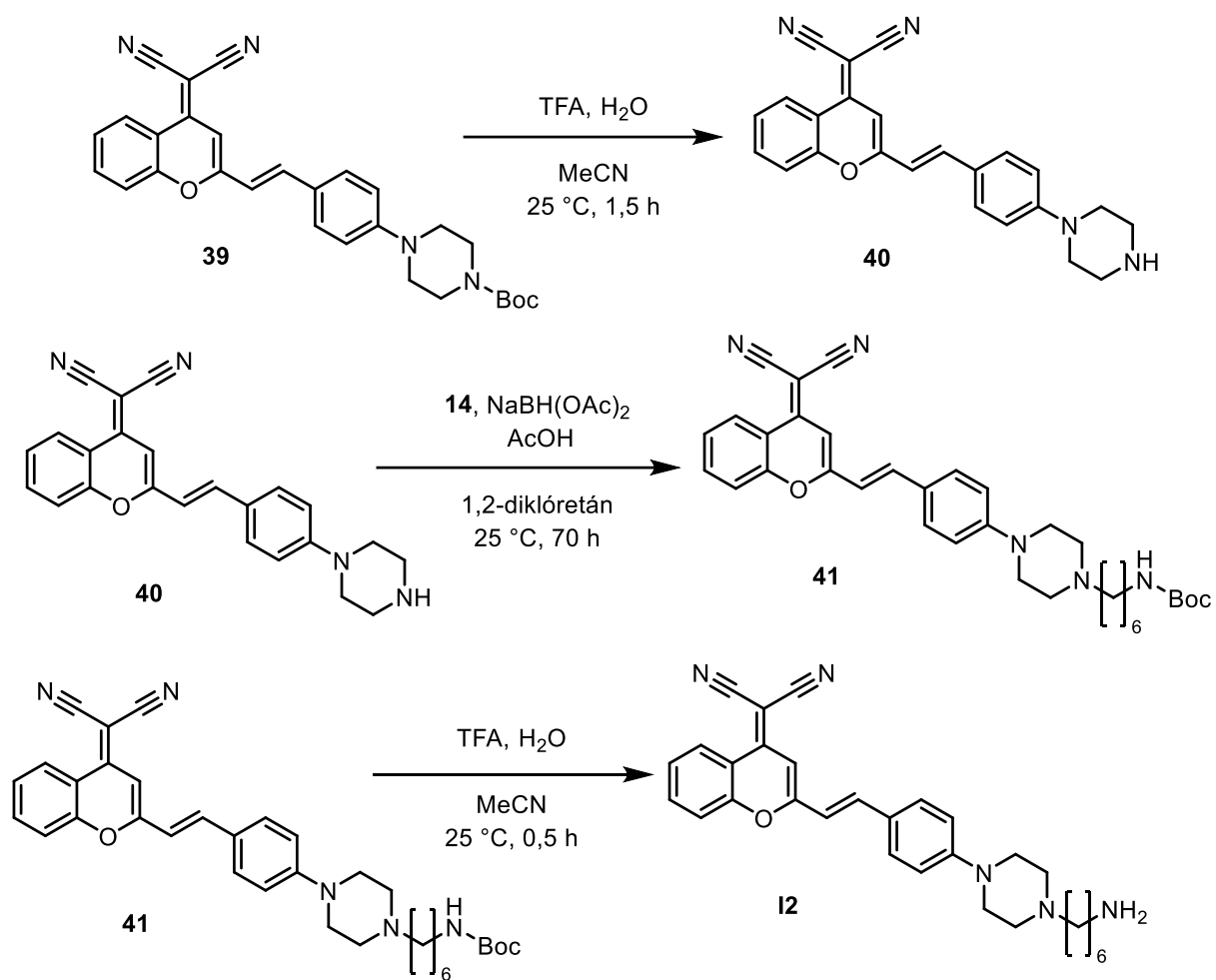
**44. ábra.** Alternatív szintézisút **II** előállítására (nem befejezett).

Az **12** festék alapváza **11**-ével megegyező, a lényeges különbség köztük, hogy előbbiben a komplexálódó oldalláncot egy piperazinon keresztül terveztük a molekulához kapcsolni **K3** festékhez hasonlóan. Ehhez a **28** terméket használtam kiindulóanyagként, amihez piperidin-katalizált kondenzációval 4-hidroxibenzaldehidet kötöttem (**37**). A hidroxilcsoporthoz bisz-(trifluorometánszulfuril)-anilinnel (PhNTf<sub>2</sub>) reagáltatva triflátcsoportot kapcsoltam (**38**), majd ezt a következő lépésben *tert*-butil-piperazin-1-karboxiláttal Boc-csoporttal védett piperazinra cseréltem Buchwald-Hartwig reakcióban (**39**). (45. ábra)



45. ábra. **39** közttermék előállítása.

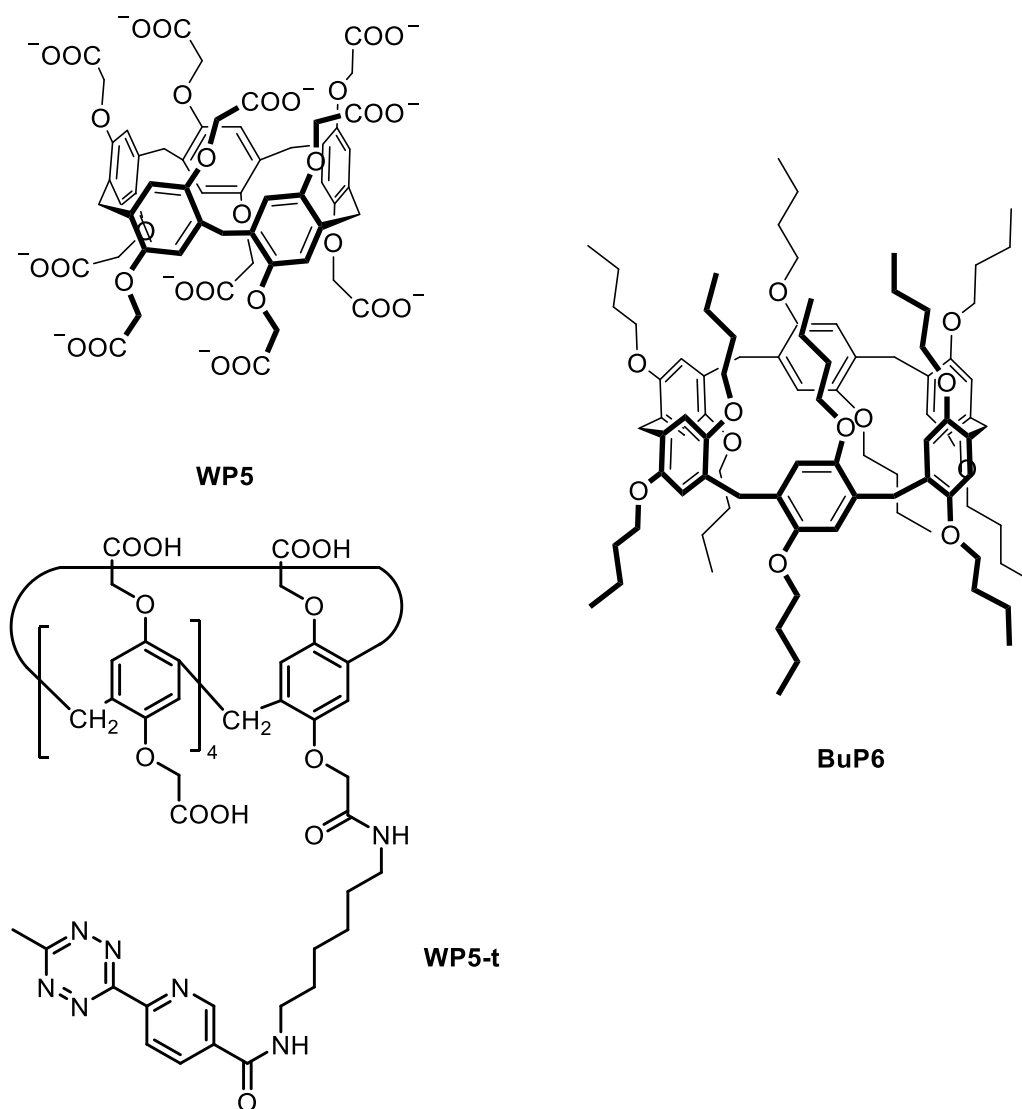
A védőcsoportot trifluorecetsavval távolítottam el (**40**) és a helyére redukív aminálással kötöttem a **15** terméket (**41**). Az oldallánc Boc-védőcsoportját szintén trifluorecetsavval távolítottam el, így kaptam a **12** festéket. (46. ábra)



46. ábra. **12** szintézise.

## 7. Eredmények összefoglalása

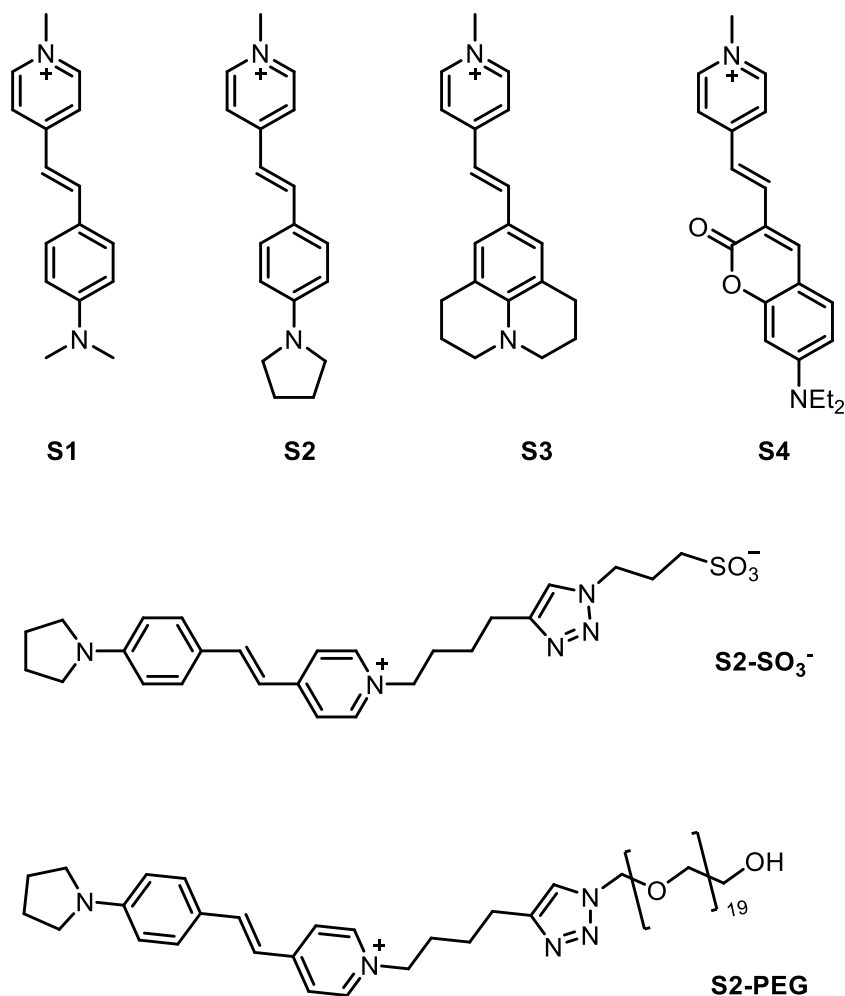
Kutatómunkám során sikeresen előállítottam a pillér[5]arén és pillér[6]arén makrociklusokat, illetve előbbinek a linkerrel és bioortogonális reakcióra alkalmas tetrazinnal monofunkcionált származékát. (47. ábra)



47. ábra. Az előállított makrociklusok.

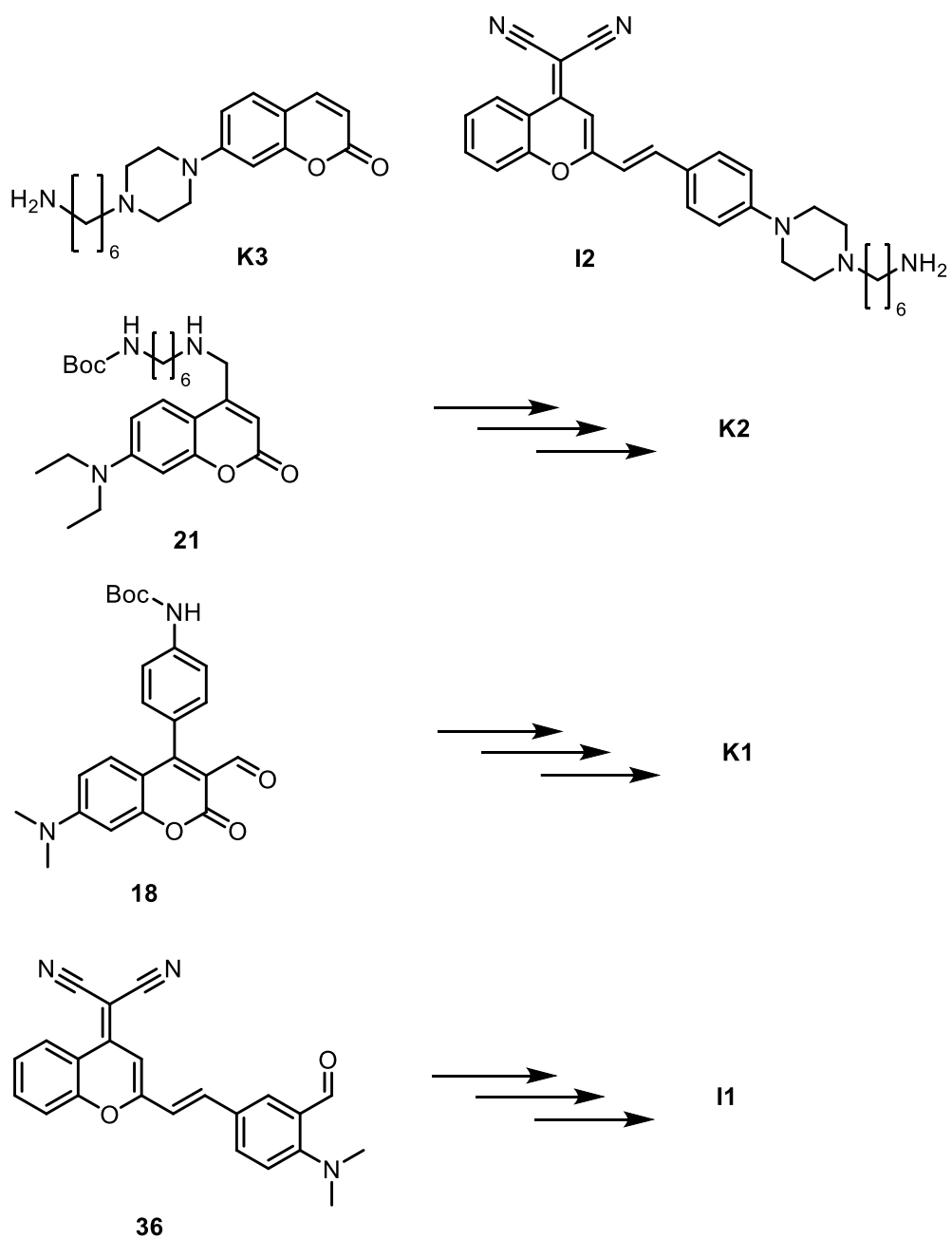
A komplexképzés spektroszkópai és mikroszkópos vizsgálatához elvégeztem az **S1**, **S2**, **S3**, **S4** festékek szintézisét. A fluoreszcens emisszió- és abszorpcióméréseik alapján az **S2** felelt meg a meghatározott céloknak, így ezt vizsgáltuk sejtes közegben fluoreszcens mikroszkóppal. A **WP5**-tel jelölt, fixált HEK293 sejtekről **S2**-t feleslegben tartalmazó közegben készült képek alapján arra lehet következtetni, hogy **S2** képes átjutni a sejtmembránon és bizonyos sejtalkotókban feldúsulva nem teszi lehetővé a pillérarénnel képzett komplexek megfigyelését.

A probléma megoldására **S2** két módosított származékát állítottam elő: **S2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>** és **S2-PEG** festékeket. (48. ábra) A spektroszkópai mérések alapján **S2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>** alkalmasnak tűnik a további biológiai kísérletekre és mikroszkópos vizsgálatra, de erre a dolgozat megírásáig nem került sor.



**48. ábra.** Az előállított **S1**, **S2**, **S3**, **S4**, **S2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>** és **S2-PEG** festékek.

A tervezett nagy Stokes eltolódású festékek közül sikeresen előállítottam **I2** és **K3** festékeket. Ezeken kívül **K1**, **K2** és **I1** termékekhez közeli köztitermékekig sikerült eljutnom. (49. ábra)



**49. ábra.** Az előállított **I2**, **K3** festékek és a **K1**, **K2**, **I1** festékek előállításához szükséges köztitermékek.

## 10. Kísérleti rész

### 10.1. Általános

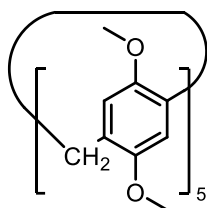
A kiindulási anyagok a Sigma-Aldrich, a Merck, az Alfa Aesar, a Fluka, a Reanal, a Romil, a Fluorochem vagy a Molar Chemicals cégek termékei, melyeket további tisztítás nélkül használtam fel a reakciókban. A vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatokhoz Merck Silica gel 60 F254 lapokat használtam. A VRK vizsgálatok során alkalmazott eluensek összetétele mindig V/V értendő. A mintafoltokat általánosan 254/365 nm-en működő UV-lámpával hívtam elő. Az anyagok flash oszlop-kromatográfiás tisztításához Zeochem márkájú 25–40 µm szemcseméretű szilika, vagy Sigma-Aldrich 50–150 µm szemcseméretű alumínium-oxid (aktivált, bázikus, Brockmann I) állófázist és Teledyne ISCO COMBI Flash műszert használtam.

Az analitikai RP-HPLC-UV/Vis-MS mérések SHIMADZU LCMS-2020 system LC-MS készülékkel történtek, Gemini C18 oszloppal (100 × 2.00 mm I.D.), amely állófázisa 5 µm szilika (110 Å pórusmérettel), illetve a spektrumok UV/Vis (220–800 nm) fotodiódá sorral és ESI-MS detektorral kerültek felvételre. A lineáris gradiens elúció (0 min. 0% B; 2,0 min. 100% B; 2,5 min. 100% B; 3,0 min. 0% B; 4,0 min. 0% B) az A eluenssel (0,1% HCOOH, 5% ACN és 94,9% víz) és a B eluenssel (0,1% HCOOH, 94,9% MeCN és 5% víz) zajlott, 0,5 ml/min áramlási sebesség mellett, 30 °C-on. A minták HPLC minőségű víz és MeCN vagy MeOH elegyében oldva készültek (1:1 V/V) 0,5 mg/ml töménységgel.

A szemipreparatív HPLC-s tisztításokat Hanbon Sci. & Tech. NP7000 márkájú eszközön végeztem, amihez Gemini C18-as fordított fázisú oszlopot kapcsoltunk, (150 x 2,1 mm I.D.), állófázisa 5 µm 110 Å pórusmérettel rendelkező szilika. Az alkalmazott eluensek 0,1% HCOOH – víz és 0,1% HCOOH – acetonitril vagy metanol voltak.

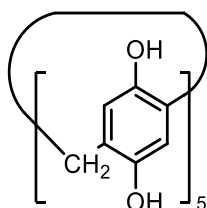
Az abszorbancia méréseket Jasco v750 fotométeren, a fluoreszcencia méréseket Jasco FP8300 spektrofluoriméteren végeztem 1 cm úthosszú kvarcküvetékben. A mérésekhez PBS (pH = 7,4) pufferoldatot használtam.

## 10.2. Szintézisek



### Dekametoxi-pillér[5]arén (MeP5)

8,00 g (1 ekv., 57,9 mmol) p-dimetoxibenzolt 400 ml 1,2-diklóretánban feloldottam, 1,74 g paraformaldehidet adtam hozzá, majd 10 percnyi szobahőmérsékleten való kevertetés után 29 ml (6,55 ekv., 379 mmol) trifluorecetsavat öntöttem hozzá. Az elegyet 2 órán át forraltam, majd lehűtöttem szobahőmérsékletre, 600 ml metanolt adtam hozzá és 1 órányi kevertetés után leszűrtem, a csapadékot levegőn szárítottam. A nyersterméket 370 ml  $\text{CHCl}_3$  és 500 ml aceton elegyéből átkristályosítottam, majd vákuumban szárítottam. <sup>13</sup> (5,56 g termék, 26%-os termelés)

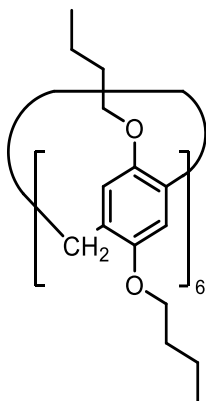


### Dekahidroxi-pillér[5]arén (OHP5)

2,00 g (1 ekv., 2,63 mmol) MeP5-öt felforraltam 300 ml frissen abszolútizált kloroformban. Az oldathoz nitrogén alatt, jeges hűtés közben 7,74 ml (30,2 ekv., 80,3 mmol)  $\text{BBr}_3$ -ot adtam. Az elegyet nitrogén alatt 4 napig kevertettem, majd nitrogénatmoszféra mellett lehűtöttem és 150 ml hideg vizet csöpögtettem hozzá. Ez után 1 órát kevertettem, vákuummal leszűrtem, 1 M sósavval és többször vízzel, végük kloroformmal mostam és levegőn szárítottam. <sup>13</sup> (1,53 g termék, 95%-os termelés)

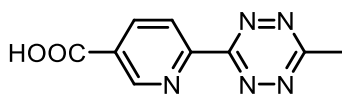


Miután elérte a 80 °C-os hőmérsékletet 62,77 g (454,2 mmol, 2,5 ekv.) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot adtam hozzá és nitrogén alatt 80 °C-on intenzíven kevertettem 3,5 napon keresztül. Miután szobahőmérsékletre hűlt, az elegyet leszűrtem, hexánnal mostam, majd a szűrletet 2×100 ml vízzel mostam, a szerves fázist MgSO<sub>4</sub>-on szárítottam és bepároltam. A nyers terméket forró metanolból átkristályosítottam.<sup>24</sup> (30,9 g termék, 76%-os termelés)



### Dodekabutoxi-pillér[6]arén (BuP6)

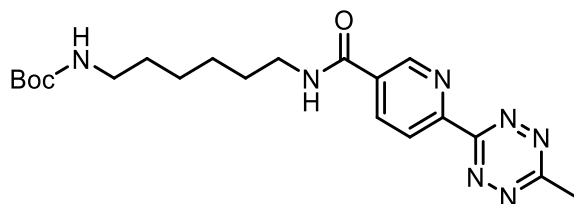
1,00 g (1 ekv., 44,8 mmol) **2** terméket és 0,27 g (0,2 ekv., 9,0 mmol) paraformaldehydet 36 ml CHCl<sub>3</sub>-ban kevertettem, miközben a lombik gázterét nitrogénnel öblítettem át alaposan. Ezután 0,9 ml (0,31 ekv., 1,332 g, 13,9 mmol) metánszulfonsavat adtam az elegyhez egy adagban és szobahőmérsékleten nitrogén alatt kevertettem 2 órán keresztül. Az elegy pH-ját Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-oldattal kb. semlegesre állítottam és a szerves fázist elválasztás után bepároltam. A szilárd nyers terméket acetonban szuszpendáltam, szűrtem, acetonnal és EtOAc-al mostam és a szűrletet újra bepároltam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-DCM (40%)).<sup>25</sup> (75 mg termék, 0,12%-os termelés)



### 6-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)-nikotinsav (3)

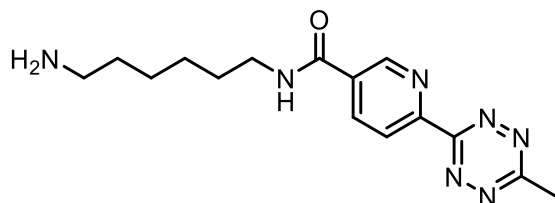
593 mg (4,00 mmol, 1 ekv.) 6-cianonikotinsavat és 90 mg (2,80 mmol, 0,7 ekv.) ként szuszpendáltam 12,8 ml (12,015 g, 100 mmol, 25 ekv.) trimetil-ortoacetátban és nitrogén alatt kevertetés közben 15 ml (300 mmol, 75 ekv.) H<sub>2</sub>N<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O-ot adtam hozzá. Az oldatot 100 °C-on nitrogén alatt kevertettem 2 órán át. Miután szobahőmérsékletre hűlt, 2 M sósavval savasra állítottam a pH-t és 10×50 ml EtOAc-tal extraháltam. A szerves fázist 1×100 ml cc.NaCl-oldattal mostam, MgSO<sub>4</sub>-on szárítottam és bepároltam. Az így kapott átmeneti termék dihidrotetrazint 120 ml DCM-ban feloldottam és frissen előállított NO/NO<sub>2</sub> gázt buborékolttam át rajta, amíg VRK alapján minden átmeneti termék át nem alakult, majd

bepároltam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: DCM-MeOH (10%)). <sup>26</sup> (50 mg termék, 6%-os termelés) LC-MS m/z (+): 218 [M+H]<sup>+</sup>



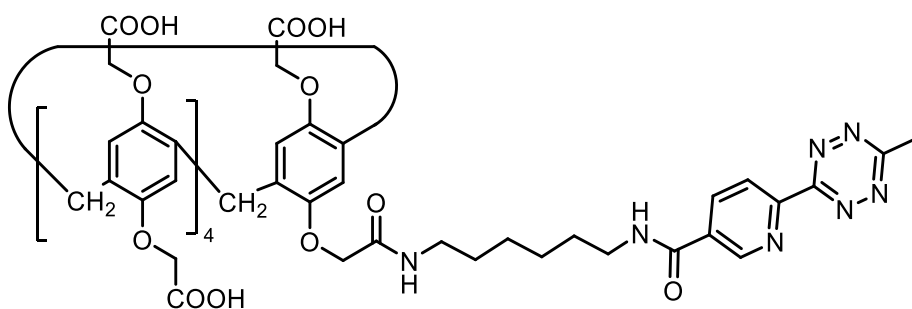
***tert*-butil-(6-(6-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)-nikotinamido)-hexil)-karbamát (4)**

50 mg (0,230 mmol, 1 ekv.) **3** terméket, 53 mg (0,460 mmol, 2 ekv.) *N*-hidroxiszukcinimidet (NHS) és 177 mg (0,921 mmol, 4 ekv.) *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid hidrokloridot (EDC·HCl) feloldottam 20 ml DCM-ban és 2 órán át kevertettem szobahőmérsékleten. Az oldatot 10 ml DCM-nal hígítottam és 1×30 ml cc.NaCl-oldattal mostam, majd a szerves fázist bepároltam és 4 ml DCM-ban újra feloldottam. Az oldathoz 55 mg (0,230 mmol, 1,1 ekv.) *tert*-butil-(6-aminohexil)-karbamátot adtam és szobahőmérsékleten 20 órán át kevertettem. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: DCM-MeOH (5%)). (48 mg termék, 50%-os termelés) LC-MS m/z (+): 319 [M+H]<sup>+</sup>



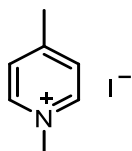
***N*-(6-aminohexil)-6-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)-nikotinamid (5)**

48 mg (0,115 mmol) **4** termékhez 0,5 ml vizet és 5 ml trifluorecetsavat (TFA) adtam, majd 1 órán át kevertettem szobahőmérsékleten. Az oldatot bepároltam, a terméket tisztítás nélkül használtam fel **WP5-t** előállításához.



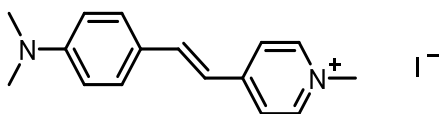
**mono(6-((5-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)-pikolinamido)-hexil)-karbamooximetil)-nonakarboximetil-pillér[5]arén (WP5-aT)**

29 mg (0,092 mmol, 0,75 ekv.) **5** terméket, 149 mg (0,123 mmol, 1 ekv.) **WP5** terméket, 21 mg (0,185 mmol, 1,5 ekv.) NHS-t és 35 mg (0,185 mmol, 1,5 ekv.) EDC·HCl-ot feloldottam 9 ml DMF-ban és szobahőmérsékleten kevertettem 44 órán át, majd bepároltam. A nyers terméket preparatív HPLC-vel tisztítottam. (82 mg termék, 45%-os termelés) LC-MS m/z (+): 1488 [M+H]<sup>+</sup>



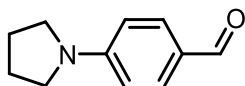
**1,4-dimetilpiridin-1-ium-jodid (6)**

8 ml metanolhoz 1 ml (1000 mg, 10,738 mol, 1 ekv.) 4-metilpiridint és 1 ml (2286 mg, 16,107 mmol, 1,5 ekv.) metil-jodidot adtam, majd szobahőmérsékleten kevertettem 24 órán át, bepároltam. A reakció kvantitatívan lejáródott. (2,5 g termék) LC-MS m/z (+): 108 [M+H]<sup>+</sup>



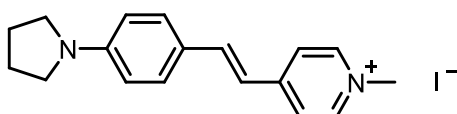
**4-(4-(dimetilamino)-sztyril)-1-metilpiridin-1-ium-jodid (S1)**

2,5 g (10,73 mmol, 1 ekv.) **6** terméket 10 ml etanolban szuszpendáltam, 1,6 g (10,73 mmol, 1 ekv.) 4-(dimetilamino)-benzaldehydet és 91 mg (1,07 mmol, 0,1 ekv.) piperidint adtam hozzá, majd az elegyet 85 °C-on kevertettem 20 órán át. A kivált piros csapadékot vákuummal szűrtem, acetonnal többször mostam és vákuummal szárítottam. A termék LC-MS alapján nem igényelt tisztítást. (3,25 g termék, 80%-os termelés) LC-MS m/z (+): 239 [M+H]<sup>+</sup>



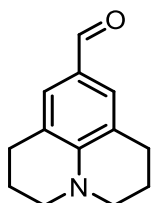
#### 4-(pirrolidin-1-il)-benzaldehyd (7)

0,37 ml (320 mg, 4,512 mmol, 1 ekv.) piperidint elegyítettem 14 ml DMF-dal és 1247 mg (4,512 mmol, 1 ekv.)  $K_2CO_3$ -ot, majd 0,50 ml (560 mg, 4,512 mmol, 1 ekv.) 4-fluorbenzaldehydet és 20 órán át kevertettem 80 °C-on. Az elegyet szobahőmérsékletre hűtöttem és 250 ml jeges vízre öntöttem. A kivált terméket vákuummal szűrtem, kétszer vízzel mostam és vákuummal szárítottam. A termék LC-MS alapján nem igényelt tisztítást. (520 mg termék, 66%-os termelés) LC-MS m/z (+): 176  $[M+H]^+$



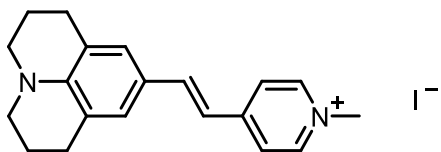
#### 1-metil-4-(4-(pirrolidin-1-il)-sztiril)-piridin-1-ium-jodid (S2)

520 mg (2,968 mmol, 1 ekv.) **7** terméket és 698 mg (2,968 mmol, 1 ekv.) **6** terméket 5 ml etanolban szuszpendáltam és 30  $\mu$ l piperidint adtam hozzá, majd 85 °C-on kevertettem 20 órán át. Az elegyet bepároltam és a nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: DCM-MeOH (10%)). (1,164 g termék, 76%-os termelés) LC-MS m/z (+): 209  $[M+H]^+$



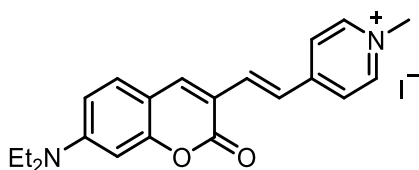
#### 9-julolidinkarboxaldehyd (8)

300 mg (1,732 mmol, 1 ekv.) julolidint feloldottam 2 ml DMF-ban, 0 °C-ra hűtöttem és csepegtetve hozzáadtam 0,22 ml (358 mg, 2,338 mmol, 1,35 ekv.)  $POCl_3$ -ot, majd szobahőmérsékleten kevertettem 20 órán át. 1,8 ml vízben 890 mg nátrium-acetátból készült oldathoz öntöttem, 1 órán át szobahőmérsékleten kevertettem, az elegyet bepároltam, 50 ml DCM-ban feloldottam, 3×30 ml vízzel és 1×30 ml cc.NaCl-oldattal mostam,  $Na_2SO_4$ -on szárítottam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis; állófázis: hexán-EtOAc (5:1)). (210 mg termék, 60%-os termelés) LC-MS m/z (+): 202  $[M+H]^+$



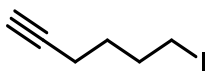
### 1-metil-4-(2-(9-julolidin)-vinil)-piridin-1-ium-jodid (S3)

210 mg (1,043 mmol, 1 ekv.) **8** terméket és 245 mg (1,043 mmol, 1 ekv.) **6** terméket feloldottam 5 ml etanolban és 10 µl piperidint adtam hozzá, majd 85 °C-on kevertettem 20 órán át. Az elegyet bepároltam, a nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis; eluens: DCM-MeOH (10%)). (227 mg termék, 52%-os termelés) LC-MS m/z (+): 291 [M+H]<sup>+</sup>



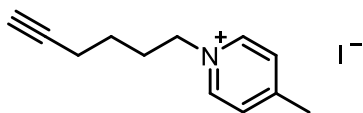
### 4-(2-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-3-il)-vinil)-1-metilpiridin-1-ium-jodid (S4)

250 mg (1,019 mmol, 1 ekv.) 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-3-karbaldehydet és 240 mg (1,019 mmol, 1 ekv.) **6** terméket feloldottam 6 ml etanolban és 10 µl piperidint adtam hozzá. Az elegyet 85 °C-on kevertettem 20 órán át. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis; eluens: DCM-MeOH (10%)). (302 mg termék, 64%-os termelés) LC-MS m/z (+): 334 [M+H]<sup>+</sup>



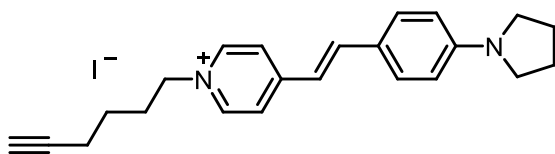
### 6-jódhex-1-in (9)

962 mg (8,25 mmol, 1,0 ekv.) 6-klórhex-1-int feloldottam 50 ml acetonban, 6,20 g (41,3 mmol, 5,0 ekv.) NaI-t adtam hozzá és 55 °C-on 16 órán át kevertettem, az elegyet vákuummal vékony réteg celliten szűrtem át, a szűrletet bepároltam, majd és 40 ml DCM-ban feloldottam, 1×20 ml telített Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oldattal mostam majd a szerves fázist MgSO<sub>4</sub>-on szárítottam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis; eluens: hexán-EtOAc (20%)). (534 mg termék, 31%-os termelés)



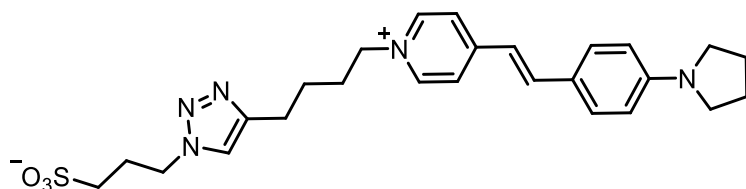
### 1-(hex-5-in-1-il)-4-metilpiridin-1-ium-jodid (10)

200 mg (0,961 mmol, 1 ekv.) **9** terméket és 134 mg (1,442 mmol, 1,5 ekv.) 4-metilpiridint feloldottam 20 ml acetonitrilben és 83 °C-on kevertettem 24 órán át. Az elegyet bepároltam és a nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis; eluens: DCM-MeOH (10%)). (230 mg termék, 79%-os termelés)



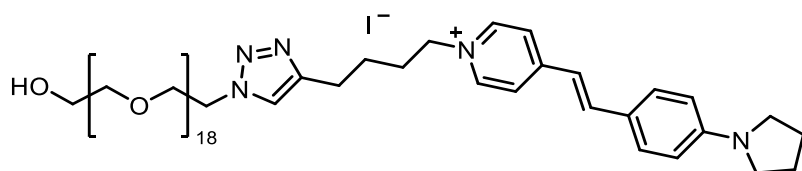
### 1-(hex-5-in-1-il)-4-(4-(pirrolidin-1-il)-sztiril)-piridin-1-ium-jodid (11)

133 mg (0,764 mmol, 1 ekv.) **7** terméket és 230 mg (0,764 mmol, 1 ekv.) **10** terméket 5 ml etanolban szuszpendáltam és 10 µl piperidint adtam hozzá, majd 85 °C-on kevertettem 20 órán át. Az elegyet bepároltam és a nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: DCM-MeOH (10%)). (884 mg termék, 76%-os termelés) LC-MS m/z (+): 331 [M+H]<sup>+</sup>



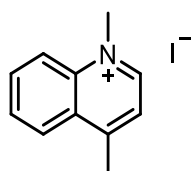
### 3-(4-(4-(4-(4-(pirrolidin-1-il)-sztiril)-piridin-1-ium-1-il)-butil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-propán-1-szulfonát (S2-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

20 mg (0,044 mmol, 1 ekv.) **11** terméket, 11 mg (0,068 mmol, 1,65 ekv.) 3-azidopropán-1-szulfonátot, 20 mg (0,098 mmol, 2,22 ekv.) Cu(AcO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O-ot, 49 mg (0,245 mmol, 5,56 ekv.) nátrium-aszkorbátot és 15 mg (0,098 mmol, 2,22 ekv.) L-hisztidint feloldottam 20 ml *tert*-butanol – víz (1:1) elegyben és 40 °C-on, N<sub>2</sub> alatt kevertettem 48 órán át. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: DCM-MeOH (15%)). <sup>27</sup> (15 mg termék, 55%-os termelés) LC-MS m/z (+): 496 [M+H]<sup>+</sup>



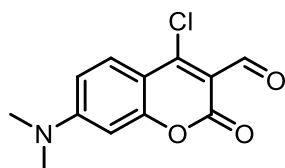
**1-(4-(1-(56-hidroxi-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54-oktadekaoxahexapentakontil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)-butil)-4-(4-(pirralidin-1-il)-sztiril)-piridin-1-ium-jodid (S2-PEG)**

100 mg (0,022 mmol, 1 ekv.) **11** terméket, 18 mg (0,020 mmol, 0,9 ekv.) azido-PEG19-alkoholt, 10 mg (0,049 mmol, 2,22 ekv.) Cu(AcO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O-ot, 24 mg (0,122 mmol, 5,56 ekv.) nátrium-aszkorbátot és 8 mg (0,049 mmol, 2,22 ekv.) L-hisztidint feloldottam 8 ml *tert*-butanol – víz (1:1) elegyben és 40 °C-on, N<sub>2</sub> alatt kevertetem 24 órán át. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: DCM-MeOH (15%)). <sup>27</sup> (10,6 mg termék, 35%-os termelés) LC-MS m/z (+): 636 [M-2H]<sup>2-</sup>



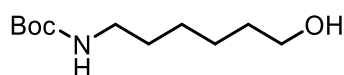
**1,4-dimetilkinolinium-jodid (12)**

0,67 ml (1 ekv., 0,72 g 5,0 mmol) 4-metilkinolint (lepidin) 7 ml 1,4-dioxánnal elegyítettem, majd 0,31 ml (1 ekv., 0,71 g, 5,0 mmol) metil-jodidot adtam hozzá és 1,5 órán át bombacsőben kevertetem 101 °C-on. Miután szobahőmérsékletre hűlt, bepároltam. A termék LC-MS alapján nem igényelt tisztítást. <sup>28</sup> (543 mg termék, 38%-os termelés)



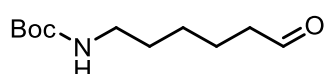
**4-klór-7-(dimetilamino)-2-oxo-2H-kromén-3-karbaldehid (13)**

7-dimetilamino-4-hidroxikumarin 0,82 g-ját (1 ekv., 4 mmol) 3 ml DMF-ban feloldottam és 828 mg (1,35 ekv., 5,4 mmol) POCl<sub>3</sub>-ot adtam hozzá és szobahőmérsékleten 24 órán át kevertetem. Az elegyet 2,22 g (6,77 ekv., 27,09 mmol) nátrium-acetát 44,4 ml vízzel készült oldatához adtam, 1 órán át kevertetem szobahőmérsékleten, majd leszűrtem a csapadékot, vízzel mostam, vákuumban szárítottam. <sup>29</sup> (0,91 g termék, 90%-os termelés) LC-MS m/z (+): 252 [M+H]<sup>+</sup>



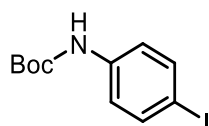
#### **tert-butyl-(6-hidroxihexil)karbamát (14)**

5,85 g (1 ekv., 50 mmol) 6-aminohexán-1-olt 50 ml DCM-ban feloldottam, 0 °C-ra hűtöttem, majd 12 g (1,1 ekv., 55 mmol) di-*tert*-butildikarbonátot adtam hozzá, és az elegyet kevertetés közben egy éjszakán át hagytam szobahőmérsékletre melegedni, majd az oldószert bepárlással eltávolítottam. Az olajos nyers terméket 90 ml 10% vizes citromsavoldattal elegyítettem és 50 ml EtOAc-tal extraháltam. A szerves fázist NaHCO<sub>3</sub>-oldattal mostam, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-on szárítottam, majd újra bepároltam. A kapott terméket további tisztítás nélkül használtam fel.<sup>30</sup> (10,64 g termék, 98%-os termelés)



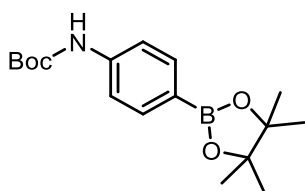
#### **tert-butyl-(6-oxohexil)karbamát (15)**

434 mg (1 ekv., 2 mmol) **14** termékhez 14 mg (0,05 ekv., 0,1 mmol) CuBr-ot, 16 mg (0,05 ekv., 0,1 mmol) 2,2'-bipiridint, 16 mg (0,05 ekv., 0,1 mmol) TEMPO-t és 16 mg (0,1 ekv., 0,2 mmol) 1-metilimidazolt acetonitrilben feloldottam. Az oldaton oxigént buborékolttam át, majd két napon keresztül kevertettem oxigén alatt, szobahőmérsékleten. Ezután az elegyhez 25 ml vizet adtam és 3×25 ml n-pentánnal és 3×25 ml dietil-éterrel extraháltam, és a szerves fázist Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-on szárítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (25%)).<sup>31</sup> (1434 mg termék, 66%-os termelés)



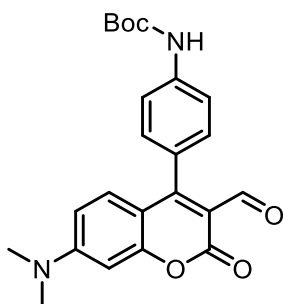
#### **tert-butyl-(4-jódmetil)-karbamát (16)**

1095 mg (5,0 mmol, 1 ekv.) 4-jódanilint 90 ml H<sub>2</sub>O-THF (1:1) elegyben feloldottam, majd 1,52 ml (1548 mg, 15 mmol, 3 ekv.) TEA-t adtam hozzá és 5 percig kevertettem szobahőmérsékleten. 0 °C-ra hűtöttem az elegyet és egy adagban 1,67 ml (1582 mg, 7,5 mmol, 1,5 ekv.) Boc<sub>2</sub>O-t adtam hozzá, majd 2 órán át 0 °C-on kevertettem, és egy éjszakán át hagytam szobahőmérsékletre melegedni. A THF-t vákuumbepárlással eltávolítottam, és a megmaradt vizes elegyet 1×40 ml DCM-nal extraháltam, a szerves fázist 2×20 ml vízzel és 1×20 ml cc.NaCl-oldattal mostam, majd MgSO<sub>4</sub>-on szárítottam és bepároltam. A termék LC-MS és VRK alapján tiszta volt.<sup>32</sup> (1315,6 mg termék, 82%-os termelés) LC-MS m/z (+): 305 [M+H]<sup>+</sup>



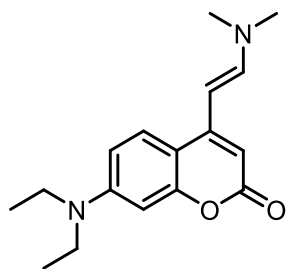
**tert-butyl-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolán-2-il)-fenil)-karbamát (17)**

200 mg (0,627 mmol, 1 ekv.) **16** terméket, 801 mg (2,508 mmol, 4 ekv.) B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub>-t és 409 mg (1,254 mmol, 2 ekv.) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot összemértem egy szárítószekrényben szárított és nitrogénárammal hűtött lombikba, majd 10 ml metanolban feloldottam őket és nitrogén alatt 75 °C-on 48 órán át kevertettem. Miután szobahőmérsékletre hűlt, vékony Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> rétegen szűrtem át, bepároltam, DCM-ben szuszpendáltam, szűrőpapíron szűrtem, és a nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (5%)).<sup>33</sup> (78 mg termék, 39%-os termelés) LC-MS m/z (+): 365 [M+H]<sup>+</sup>



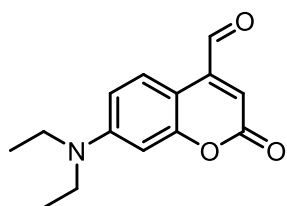
**tert-butyl-(4-(7-(dimetilamino)-3-formil-2-oxo-2H-kromén-4-il)-fenil)-karbamát (18)**

Szárítószekrényben szárított és nitrogénárammal hűtött lombikban 56 mg (0,222 mmol, 1 ekv.) **13** terméket, 78 mg (0,244 mmol, 1,1 ekv.) **17** terméket, 96 mg (0,444 mmol, 2 ekv.) K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-ot, 13,7 mg (3,33·10<sup>-5</sup> mmol, 0,15 ekv.) SPhos-t és 0,9 mg (2,22·10<sup>-6</sup> mmol, 0,01 ekv.) Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> katalizátort szuszpendáltam 8,4 ml THF-ban és kevertetés mellett nitrogén buborékoltattam át a keveréken 20 percen keresztül, majd nitrogén alatt 60 °C-on kevertettem 48 órán át. Miután szobahőmérsékletre hűlt, az elegyet celliten szűrtem át, acetonnal mostam és a szűrletet bepároltam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: DCM-MeOH (2%)).<sup>34</sup>



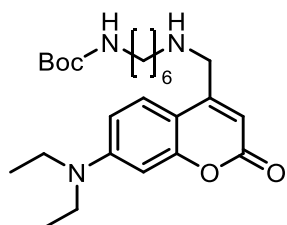
**7-(diethylamino)-4-(2-(dimethylamino)-vinil)-2H-kromén -2-on (19)**

5,00 g (21,6 mmol, 1 ekv.) 7-(diethylamino)-2-oxo-4-metil-2H-kromént és 5,15 g (43,2 mmol, 2 ekv.) *N,N*-dimetilformamid-dimetilacetált feloldottam 18,5 ml DMF-ban és 20 órán át forraltam 155 °C-on nitrogén alatt. Miután szobahőmérsékletre hűlt, az elegyet vékony réteg szilikán szűrtem át, EtOAc-tal mostam. A szűrletet 1×100 ml cc.NaHCO<sub>3</sub>-oldattal és 1×100 ml cc.NaCl-oldattal mostam. A szerves fázist Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-on szárítottam, majd az oldószert vákuumbepárlással eltávolítottam. A **20** terméké alakítás előtt nem tisztítottam. LC-MS *m/z* (+): 260 [M+H]<sup>+</sup>



**7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-4-karbaldehid (20)**

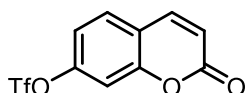
6,191 g (21,6 mmol, 1 ekv.) **19** terméket feloldottam 22,5 ml THF-H<sub>2</sub>O (1:1) elegyben és 9,25 g (43,2 mmol, 2 ekv.) NaIO<sub>4</sub>-ot adtam hozzá. Az oldatot 1,5 órán át kevertettem 80 °C-on. Miután szobahőmérsékletre hűlt, 5×10 ml EtOAc-tal extraháltam, 1×20 ml cc.NaCl-oldattal és 1×20 ml cc.Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-oldattal mostam, MgSO<sub>4</sub>-on szárítottam és bepároltam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (25%)). LC-MS *m/z* (+): 246 [M+H]<sup>+</sup>



**tert-butyl-(6-(((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-kromén-4-il)-metil)-amino)-hexil)-karbamát (21)**

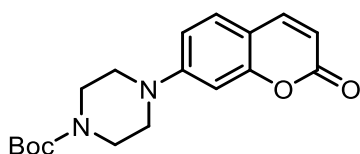
A **20** termék 200 mg-ját (0,815 mmol, 1 ekv.), 176 mg (0,815 mmol, 1 ekv.) *tert*-butyl-(6-aminoheksil)-karbamátot és 259 mg (1,223 mmol, 1,5 ekv.) NaBH(OAc)<sub>3</sub>-t

feloldottam 6 ml 1,2-diklóretánban, majd 163 µl ecetsavat adtam az oldathoz, és 24 órán át kevertettem nitrogén alatt szobahőmérsékleten. Ezután az elegyhez 6 ml 1,2-diklóretánt és 10 ml DCM-t adtam, majd 3×10 ml vízzel, 3×10 ml cc.NaHCO<sub>3</sub>-oldattal és 1×10 ml cc.NaCl-oldattal mostam, MgSO<sub>4</sub>-on szárítottam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (25%-100%)).<sup>35</sup> (73,1 mg termék, 20%-os termelés) LC-MS m/z (+): 675 [M+H]<sup>+</sup>



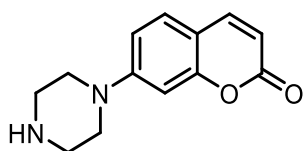
### 2-oxo-2H-kromén-7-il-trifluormetánszulfonát (22)

1,62 g (1,00 mmol, 1 ekv.) 7-hidroxi-2H-kromén-2-on-t, 3,75 g (10,50 mmol, 10,05 ekv.) PhNTf<sub>2</sub>-ot és 3,04 g (30,04 mmol, 10,04 ekv.) trietilamint feloldottam 50 ml DCM-ban (etanol mentes, amilénnel stabilizált), majd 45 °C-on kevertettem 3 órán át. Az elegyet 3×60 ml cc.NaHCO<sub>3</sub>-oldattal mostam, MgSO<sub>4</sub>-on szárítottam és bepároltam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (20%)). (2,80 g termék, 95%-os termelés)



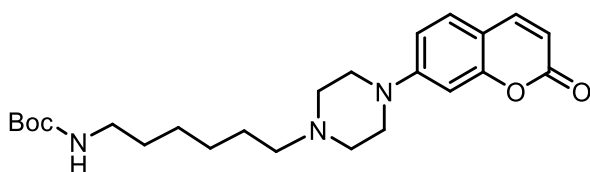
### tert-butyl-4-(2-oxo-2H-kromén-7-il)-piperazin-1-karboxilát (23)

294 mg (1,000 mmol, 1 ekv.) **22** terméket, 224 mg (1,200 mmol, 1,2 ekv.) *tert*-butil-piperazin-1-karboxilátot, 22,5 mg (0,100 mmol, 0,1 ekv.) Pd(OAc)<sub>2</sub>-ot, 94 mg (0,150 mmol, 0,15 ekv.) BINAP katalizátorligandumot és 456 mg (1,400 mmol, 1,4 ekv.) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot szuszpendáltam 6 ml toluolban, majd 10 percig N<sub>2</sub>-t buborékolattam át az elegyen. 100 °C-on kevertettem 20 órán át N<sub>2</sub> alatt, majd a nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (30%)). (110 mg termék, 33%-os termelés)



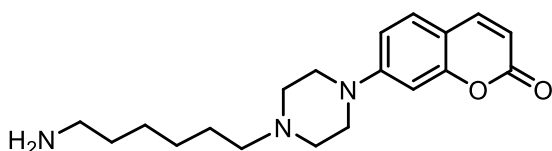
#### 7-(piperazin-1-il)-2*H*-kromén-2-on (24)

99 mg (0,30 mmol) **23** terméket 2 ml DCM-ban feloldottam, 1 ml TFA-at adtam hozzá, egy csepp vizet és 2 órán át kevertettem szobahőmérsékleten. Az oldatot bepároltam, a terméket tisztítás nélkül használtam fel **25** előállításához.



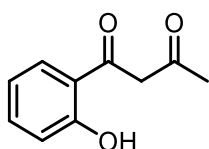
#### tert-butil-(6-(4-(2-oxo-2*H*-kromén-7-il)-piperazin-1-il)-hexil)-karbamát (25)

62 mg (0,27 mmol, 1 ekv.) **24** terméket feloldottam 3 ml 1,2-diklóretánban és 65 mg (0,27 mmol, 1 ekv.) **15** terméket, 95 mg (0,45 mmol, 1,5 ekv.) NaBH(OAc)<sub>3</sub>-ot és 0,1 ml tömény ecetsavat adtam hozzá. Az elegyet 20 órán át kevertettem szobahőmérsékleten N<sub>2</sub> alatt, majd bepároltam. A terméket tisztítás nélkül használtam fel **K3** előállításához. LC-MS m/z (+): 430 [M+H]<sup>+</sup>



#### 7-(4-(6-aminohexil)-piperazin-1-il)-2*H*-kromén-2-on (K3)

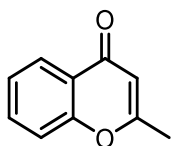
90 mg **25** terméket 5 ml acetonitrilben feloldottam, 0,5 ml vizet és 4 ml TFA-at adtam hozzá, majd 1,5 órán át szobahőmérsékleten kevertettem. A reakcióelegyet bepároltam, a nyers terméket preparatív HPLC-vel tisztítottam.



#### 1-(2-hidroxifenil)-bután-1,3-dion (26)

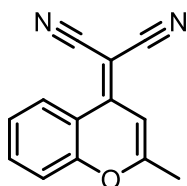
Száritószekrényben szárított és nitrogénárammal hűtött lombikban 9 ml vízmentes THF-ban szuszpendáltam 3,53 g 60%-os (2,118 g, 88,2 mmol, 4,01 ekv.) nátrium-hidridet nitrogén alatt, majd 5,42 ml EtOAc-ból, 2,5 ml vízmentes THF-ból és 2,65 ml

2'-hidroxiacetofenonból készült elegyet csepegtettem a szuszpenzióhoz. A hozzáadagolás után még 5 percig kevertettem szobahőmérsékleten, nitrogén alatt, majd kevés vízzel hígítottam, jégre öntöttem és 6 M sósavval kb. semlegesre állítottam a pH-t. Ezt az oldatot 2×50 ml és 1×30 ml Et<sub>2</sub>O-rel extraháltam, a szerves fázist 1×50 ml cc.NaCl-oldattal mostam, MgSO<sub>4</sub>-on szárítottam. A nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (25%)). <sup>36</sup> (2,755 g termék, 70%-os termelés) LC-MS m/z (+): 179 [M+H]<sup>+</sup>



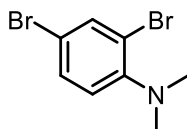
### 2-metil-4*H*-kromén-4-on (27)

A **26** termék 2,755 g-ját (15,5 mmol, 1 ekv.) 155 ml metanolban feloldottam, 256 µl (220 mg, 3,1 mmol, 0,2 ekv.) pirrolidint és 28 µl (28 mg, 1,6 mmol, 0,1 ekv.) vizet adtam hozzá és nitrogén alatt szobahőmérsékleten kevertettem 24 órán át. Ez után az oldószert vákuumbepárlással eltávolítottam, a nyersterméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: DCM-MeOH (2%)). <sup>37</sup> (1,362 g termék, 54%-os termelés) LC-MS m/z (+): 161 [M+H]<sup>+</sup>



### 2-(2-metil-4*H*-kromén-4-ilidén)-malononitril (28)

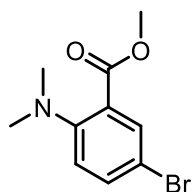
500 mg (3,082 mmol, 1 ekv.) **27** terméket és 246 mg (3,729 mmol, 1,21 ekv.) malonitrilt feloldottam 2,5 ml ecetsav-anhidridben és nitrogén alatt 140 °C-on 24 órán át kevertettem. Az elegyet bepároltam, majd 20 ml vizet adtam hozzá és 30 percig forraltam. Az oldatot még 10 ml vízzel hígítottam és 3×20 ml DCM-nal extraháltam, 1×0 ml cc.NaCl-oldattal mostam és Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-on szárítottam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (25%)). <sup>38</sup>



### 2,4-dibróm-*N,N*-dimetilanilin (29)

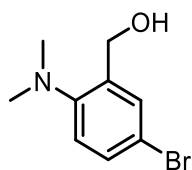
956 µl (1 g, 8,25 mmol, 1 ekv.) *N,N*-dimetilanilint 10 ml tömény ecetsavban kevertettem, majd 850 µl (2,637 g, 16,50 mmol, 2 ekv.) Br<sub>2</sub> és 16,5 ml DCM elegyét csepegtettem hozzá

3 perc alatt. Ez után 5 percig kevertetem az elegyet, majd 100 ml vízzel hígítottam és szilárd NaOH-dal az oldat pH-ját lúgosra állítottam. Az elegyet 4×25 ml Et<sub>2</sub>O-rel extraháltam, a szerves fázist 1×50 ml cc.NaHSO<sub>3</sub>-oldattal és 1×50 ml cc.NaCl-oldattal mostam, MgSO<sub>4</sub>-on szárítottam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-DCM (1%)). <sup>39</sup> (799 mg termék, 35%-os termelés) LC-MS m/z (+): 280 [M+H]<sup>+</sup>



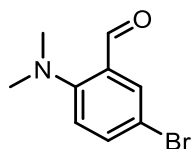
### metil-5-bróm-2-(dimetilamino)-benzoát (30)

300 mg (1,304 mmol, 1 ekv.) metil-2-amino-5-brómanilint és 757 mg (5,477 mmol, 3,2 ekv.) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot szuszpendáltam 26 ml acetonitrilben, majd 0,84 ml (5,477 mmol, 3,2 ekv.) metil-jodidot adtam hozzá. Az elegyet bombacsőben 4 napig 80 °C-on kevertetem. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (20%)). (230 mg termék, 68%-os termelés) LC-MS m/z (+): 246 [M+H]<sup>+</sup>



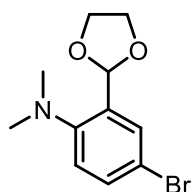
### (5-bróm-2-(dimetilamino)-fenil)-metanol (31)

230 mg (0,891 mmol, 1 ekv.) **30** terméket feloldottam 10 ml absz.DCM-ban és N<sub>2</sub> alatt kevertetve -78 °C-ra hűtöttem, 1,78 ml diizobutil-alumínium-hidridet (DIBAL-H) (1 M oldat toluolban, 1,782 mmol, 2 ekv.) adtam hozzá csöpögtetve. Az oldatot 1 órán át kevertetem -78 °C-on, majd 30 ml Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ot adtam az elegyhez, ezután kevés szilárd Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ot és szobahőmérsékleten kevertetem 1 órán át. Az elegyet vékony réteg celliten szűrtem át, elválasztottam a szűrlet két fázisát és a szerves fázist bepároltam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (20%)). (89 mg termék, 43%-os termelés)



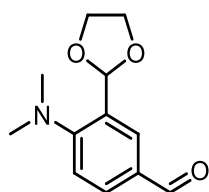
#### 5-bróm-2-(dimetilamino)-benzaldehyd (32)

89 mg (0,390 mmol, 1 ekv.) **31** terméket és 339 mg (3,900 mmol, 10 ekv.)  $\text{MnO}_2$ -ot acetonitrilben szuszpendáltam és 24 órán át kevertettem szobahőmérsékleten. Az elegyet szűrtem, háromszor acetonitrillel mostam, majd a szűrletet bepároltam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (15%)). (68 mg termék, 76%-os termelés) LC-MS  $m/z$  (+): 376  $[\text{M}+\text{H}]^+$



#### 4-bróm-2-(1,3-dioxolán-2-il)-N,N-dimetilanilin (33)

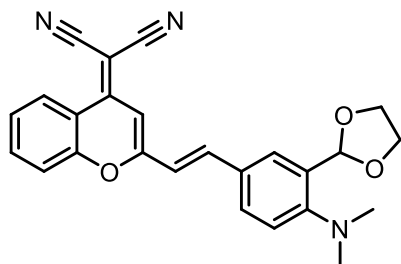
68 mg (0,298 mmol, 1 ekv.) **32** terméket és 1 mg (0,006 mmol, 0,02 ekv.) p-toluolszulfonsavat (TsOH) 20 ml toluolban feloldottam és 25  $\mu\text{l}$  (0,447 mmol, 1,5 ekv.) etilén-glikolt adtam az oldathoz, majd 110 °C-on kevertettem 48 órán át Dean-Stark vízleválasztó feltétellel. A reakcióelegyet bepároltam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (20%)). (46 mg termék, 57%-os termelés) LC-MS  $m/z$  (+): 274  $[\text{M}+\text{H}]^+$



#### 4-(dimetilamino)-3-(1,3-dioxolán-2-il)-benzaldehyd (34)

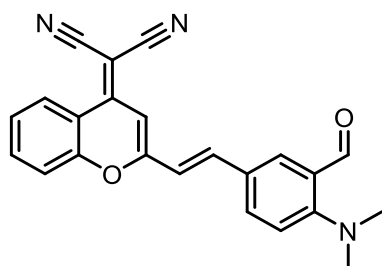
46 mg (0,169 mmol, 1 ekv.) **33** terméket nitrogén alatt feloldottam 3 ml vízmentes THF-ban, -78 °C-ra hűtöttem az oldatot, majd 0,2 ml n-BuLi-oldatot (2,5 M hexánban, 0,473 mmol, 2,8 ekv.) és  $\text{N}_2$  alatt kevertettem -78 °C-on 2 órán át. 0,19 ml vízmentes DMF-ot adtam (2,467 mmol, 14,6 ekv.) 0,19 ml vízmentes THF-hoz, majd az elegyet a lehűtött oldathoz adtam és 22 órán át kevertettem szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet 15 ml EtOAc-al hígítottam, 3×15 ml vízzel, 1×15 ml cc.NaCl-oldattal mostam, majd a szerves fázist  $\text{MgSO}_4$ -on szárítottam

és bepároltam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (15%)). (3 mg termék, 8%-os termelés)



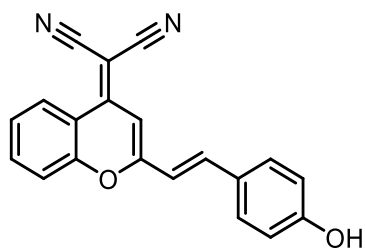
### 2-(2-(4-(dimetilamino)-3-(1,3-dioxolán-2-il)-sztiril)-4H-kromén-4-ilid)-malonitril (35)

6 mg (0,028 mmol, 2 ekv.) **28** terméket feloldottam 2 ml acetonitrilben és 3 mg (0,014 mmol, 1 ekv.) **34** termékhez adtam, majd 15,2 µl piperidint adtam az elegyhez és 82 °C-on kevertettem 20 órán át. A reakcióelegyet bepároltam, a terméket a kis mennyisége miatt tisztítás nélkül használtam fel **36** előállításához. LC-MS  $m/z$  (+): 412  $[M+H]^+$



### 2-(2-(4-(dimetilamino)-3-formilsztiril)-4H-kromén-4-ilid)-malonitril (36)

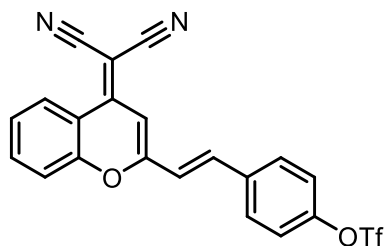
0,8 mg **35** terméket feloldottam 1 ml metanolban és 0,3 ml 2 M HCl-oldatot adtam hozzá, majd 4 órán át kevertettem szobahőmérsékleten. Az elegyet bepároltam. A várt termék LC-MS-sel kimutatható volt.



### 2-(2-(4-hidroxisztiril)-4H-kromén-4-ilidén)-malonitril (37)

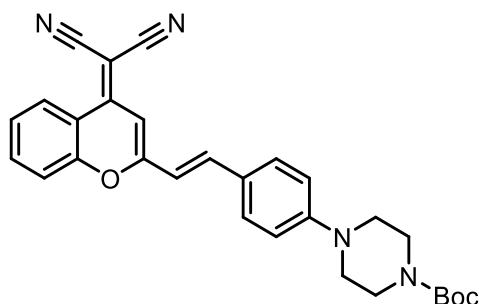
400 mg (1,921 mmol, 1 ekv.) **28** terméket 19 ml etanolban szuszpendáltam, 235 mg (1,921 mmol, 1 ekv.) 4-hidroxibenzaldehidet és 759 µl (654 mg, 7,684 mmol, 4 ekv.) piperidint adtam hozzá, majd az elegyet 85 °C-on kevertettem 3,5 órán át és bepároltam. A nyers terméket

oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: DCM-MeOH (5%)). <sup>40</sup>  
(195 mg termék, 32%-os termelés) LC-MS m/z (-): 311 [M+H]<sup>+</sup>



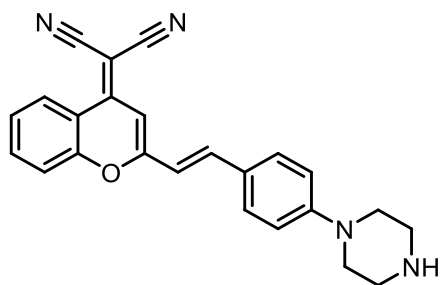
#### 4-(2-(4-(dicianometilén)-4*H*-kromén-2-il)-vinil)-fenil-trifluormetánszulfonát (38)

195 mg (0,624 mmol, 1 ekv.) **37** terméket, 234 mg (0,655 mmol, 1,05 ekv.) PhNTf<sub>2</sub>-ot és 137 µl (189 mg, 1,872 mmol, 3 ekv.) trietilamint feloldottam 15 ml DCM-ban (etanol mentes, amilénnel stabilizált), majd 45 °C-on kevertetem 3 órán át. Az elegyet 10 ml DCM-nal hígítottam és 3×30 ml cc.NaHCO<sub>3</sub>-oldattal mostam, MgSO<sub>4</sub>-on szárítottam és bepároltam. A nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (25%)). (193 g termék, 70%-os termelés)



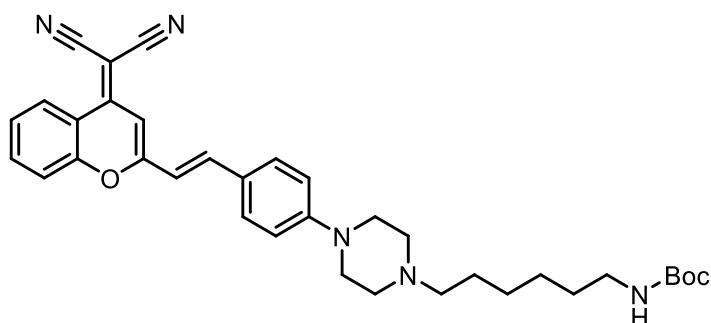
#### *tert*-butil 4-(4-(2-(4-(dicianometilén)-4*H*-kromén-2-il)-vinil)-fenil)-piperazin-1-karboxilát (39)

193 mg (0,434 mmol, 1 ekv.) **38** terméket, 97 mg (0,521 mmol, 1,2 ekv.) *tert*-butil-piperazin-1-karboxilátot, 10 mg (0,043 mmol, 0,1 ekv.) Pd(OAc)<sub>2</sub>-ot, 40 mg (0,065 mmol, 0,15 ekv.) BINAP katalizátorligandumot és 141 mg (0,608 mmol, 1,4 ekv.) Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot szuszpendáltam 5 ml toluolban, majd 10 percig N<sub>2</sub>-t buborékolattam át az elegyen. 100 °C-on kevertetem 20 órán át N<sub>2</sub> alatt, majd a nyers terméket oszlopkromatográfiával tisztítottam (szilikagél állófázis, eluens: hexán-EtOAc (60%)). (60 mg termék, 29%-os termelés) LC-MS m/z (+): 481 [M+H]<sup>+</sup>



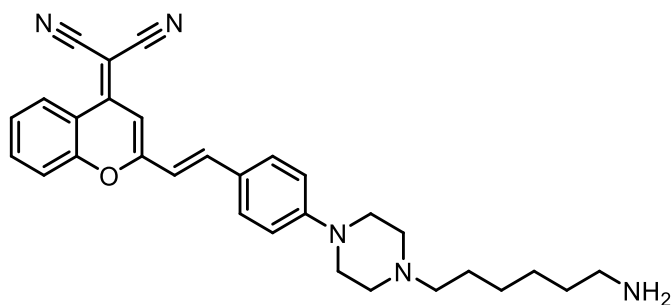
#### 2-(2-(4-(piperazin-1-yl)-sztiril)-4H-kromén-4-ilidén)malonitril (40)

60 mg **39** terméket 1 ml acetonitrilben feloldottam, majd 0,5 ml vizet és 2 ml TFA-at adtam hozzá és 1,5 órán át kevertettem szobahőmérsékleten. A reakcióelegyet bepároltam, a nyers terméket tisztítás nélkül használtam fel **41** előállításához.



#### tert-butyl-(6-(4-(4-(2-(4-(dicianometilén)-4H-kromén-2-il)-vinil)-fenil)-piperazin-1-il)-hexil)-karbamát (41)

48 mg (0,125 mmol, 1 ekv.) **40** termékhez 40 mg (0,186 mmol, 1,49 ekv.) **15** terméket és 55 mg (0,260 mmol, 2,08 ekv.) NaBH(OAc)<sub>3</sub>-ot adtam, 6 ml 1,2-diklóretánban szuszpendáltam és 0,25 ml (263 mg, 4,371 mmol, 35 ekv.) tömény ecetsavat adtam hozzá. Az elegyet szobahőmérsékleten kevertettem 70 órán keresztül, majd bepároltam. A terméket tisztítás nélkül használtam fel **12** előállításához. LC-MS m/z (+): 580 [M+H]<sup>+</sup>



**2-(2-(4-(4-(6-aminohexil)-piperazin-1-il)-sztiril)-4*H*-kromén-4-ilidén)-malonitril (I2)**

72 mg (0,125 mmol) **42** terméket feloldottam 6 ml acetonitrilben, majd 0,5 ml vizet és 4 ml TFA-at adtam hozzá. Az elegyet szobahőmérsékleten kevertettem 30 percen át és bepároltam, vákuummal szárítottam. A nyers terméket preparatív HPLC-vel tisztítottam. (6,5 mg termék)  
 LC-MS  $m/z$  (+): 480  $[M+H]^+$

### 10.3. Biológiai kísérletek

**10.3.1. HEK293T sejtek passzálása.** A kísérletekhez HEK293T (ATCC; CRL-3216, Manassas, VA, USA) sejt kultúrát használtunk, a sejtek inkubálását 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában végeztük Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco 21063-029) tápoldatban, amelyet 10% FBS-sel (Gibco 10500-064), 1% penicillin-sztreptomicinnel (Gibco Life Technologies 15140-122), 1% L-GlutaMAX-szal (Gibco 35050-061) és 1% nátrium-piruváttal (Gibco 11360-070) egészítettünk ki. A sejtek passzálását tripszines (Gibco 25200-056) kezelést követően 3-4 naponta, legfeljebb 20 passzálsig végeztük. A kamrák felületét 0,01 mg/ml Poly-L-lizinnel (Sigma P5899) kezeltük 4-8 órán át, majd a sejteket 160000 sejt/ml-es szuszpenzióként tettük rá 48 órával a transzfekció előtt, majd azokat a felületet 70-80%-os borítottságáig növesztettük. A kísérleteket  $\mu$ -Slide 8 kamrás lemezek (Ibidi 80827; 250  $\mu$ l/well) végeztük.

**10.3.2. Inzulinreceptorok jelölése bioortogonálisan reaktív csoporton keresztül WP5-t pillér[5]arén származékkal és a sejtek fixálása.** A transzfektáláshoz jetPRIME® Transfection Reagent-t (Polyplus 101000015) használtunk a gyártó által megadott protokoll szerint. IRK<sup>676TAG</sup>-Halotag (a laborunkban korábban elkészített), NESPyIRS<sup>AF</sup>/tRNA<sup>Pyl</sup><sub>CUA</sub> (Dr. Edward Lemke kutatócsoportjától kapott) plazmidokat és 250  $\mu$ M BCNK-t adtunk a jetPRIME® elegyhez. A plazmidokat 0,25  $\mu$ g/kamra mennyiségben alkalmaztuk. 4 órás transzfekció után az oldatokat DMEM-re cseréltük és egy éjszakán át inkubáltuk a korábban leírt körülmények között (10.3.1. rész). A sejteket másnap DMEM-el mostuk és 60 percen át 3  $\mu$ M WP5-t-oldattal kezeltük, közvetlenül ezután indikátortmentes DMEM-el kétszer mostuk, majd még egyszer 2 óra elteltével.

A mintákat ezután PBS-ben oldott 2%-os formaldehidoldattal (Sigma F8775) fixáltuk és PBS-el mostuk háromszor. A mintákat 1 napig (4 °C-on tároltuk), majd mikroszkópos vizsgálatok előtt az S2 festéket 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M és 10  $\mu$ M koncentrációjú, PBS-el készült oldatokként adtuk hozzájuk.

**10.3.3. Fluoreszcens konfokális mikroszkópos vizsgálatok.** A konfokális képeket Leica TCS SP8 mikroszkóppal készítettük 552 nm-en gerjesztve, Leica HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL olajimmerziós objektívvel, Leica HyD detektorral 570-800 nm-es detektálási tartománnyal. A képeket Leica Application Suite X és ImageJ szoftverekkel dolgoztuk fel (NIH).

## 11. Irodalomjegyzék

1. The Nobel Prize in Chemistry 2014. *NobelPrize.org*  
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2014/summary/>. (letöltve: 2022.11.08.)
2. Willig, K. I. *et al.* Nanoscale resolution in GFP-based microscopy. *Nat. Methods* **3**, 721–723 (2006).
3. Heilemann, M., Margeat, E., Kasper, R., Sauer, M. & Tinnefeld, P. Carbocyanine Dyes as Efficient Reversible Single-Molecule Optical Switch. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 3801–3806 (2005).
4. Vaughan, J. C., Dempsey, G. T., Sun, E. & Zhuang, X. Phosphine Quenching of Cyanine Dyes as a Versatile Tool for Fluorescence Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1197–1200 (2013).
5. Li, H. & Vaughan, J. C. Switchable Fluorophores for Single-Molecule Localization Microscopy. *Chem. Rev.* **118**, 9412–9454 (2018).
6. Tian, Z. & Li, A. D. Q. Photoswitching-Enabled Novel Optical Imaging: Innovative Solutions for Real-World Challenges in Fluorescence Detections. *Acc. Chem. Res.* **46**, 269–279 (2013).
7. Nienhaus, K. & Ulrich Nienhaus, G. Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution. *Chem Soc Rev* **43**, 1088–1106 (2014).
8. Uno, S. *et al.* A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. *Nat. Chem.* **6**, 681–689 (2014).
9. Sharonov, A. & Hochstrasser, R. M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 18911–18916 (2006).
10. Sasmal, R. *et al.* Dynamic host–guest interaction enables autonomous single molecule blinking and super-resolution imaging. *Chem. Commun.* **55**, 14430–14433 (2019).

11. Ni, X.-L. *et al.* Cucurbit[n]uril-based coordination chemistry: from simple coordination complexes to novel poly-dimensional coordination polymers. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 9480–9508 (2013).
12. Murray, J., Kim, K., Ogoshi, T., Yao, W. & Gibb, B. C. The aqueous supramolecular chemistry of cucurbit[n]urils, pillar[n]arenes and deep-cavity cavitands. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 2479–2496 (2017).
13. Ogoshi, T., Hashizume, M., Yamagishi, T. & Nakamoto, Y. Synthesis, conformational and host–guest properties of water-soluble pillar[5]arene. *Chem. Commun.* **46**, 3708–3710 (2010).
14. Bojtár, M. *et al.* Pillararene-based fluorescent indicator displacement assay for the selective recognition of ATP. *Sens. Actuators B Chem.* **248**, 305–310 (2017).
15. Bojtár, M., Paudics, A., Hessz, D., Kubinyi, M. & Bitter, I. Amino acid recognition by fine tuning the association constants: tailored naphthalimides in pillar[5]arene-based indicator displacement assays. *RSC Adv.* **6**, 86269–86275 (2016).
16. The Nobel Prize in Chemistry 2022. *NobelPrize.org*  
<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/summary/>.
17. Jennifer A Prescher & Bertozzi, C. R. Chemistry in living systems. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 13–21 (2005).
18. Kozma, E., Demeter, O. & Kele, P. Bio-orthogonal Fluorescent Labelling of Biopolymers through Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactions. *ChemBioChem* **18**, 486–501 (2017).
19. Paudics, A., Kubinyi, M., Bitter, I. & Bojtár, M. Carboxylato-pillar[6]arene-based fluorescent indicator displacement assays for the recognition of monoamine neurotransmitters. *RSC Adv.* **9**, 16856–16862 (2019).

20. Sednev, M. V., Belov, V. N. & Hell, S. W. Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: a review. *Methods Appl. Fluoresc.* **3**, 042004 (2015).
21. Zhu, B., Cheng, Y., Li, G., Yang, S. & Zhang, Z. Synthesis and evaluation of styrylpyran fluorophores for noninvasive detection of cerebral  $\beta$ -amyloid deposits. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 827–834 (2016).
22. Bojtár, M., Szakács, Z., Hessz, D., Kubinyi, M. & Bitter, I. Optical spectroscopic studies on the complexation of stilbazolium dyes with a water soluble pillar[5]arene. *RSC Adv.* **5**, 26504–26508 (2015).
23. Chin, J. W. Expanding and reprogramming the genetic code of cells and animals. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 379–408 (2014).
24. Moy, C. L., Kaliappan, R. & McNeil, A. J. Aryl Trihydroxyborate Salts: Thermally Unstable Species with Unusual Gelation Abilities. *J. Org. Chem.* **76**, 8501–8507 (2011).
25. Mirzaei, S., Wang, D., Lindeman, S. V., Sem, C. M. & Rathore, R. Highly Selective Synthesis of Pillar[n]arene (n = 5, 6). *Org. Lett.* **20**, 6583–6586 (2018).
26. Cserép, G. B. *et al.* Synthesis and Evaluation of Nicotinic Acid Derived Tetrazines for Bioorthogonal Labeling. *Synthesis* **47**, 2738–2744 (2015).
27. Ke, X.-S., Tang, J., Chen, J.-J., Zhou, Z.-Y. & Zhang, J.-L.  $\beta$ -Ionic Conjugated Chlorin-Type Photosensitizers Based on Porpholactone: Synthesis, Photophysical Properties, and Photodynamic Activity. *ChemPlusChem* **80**, 237–252 (2015).
28. Synthesis of a Photostable Energy-Transfer Pair for “DNA Traffic Lights” - Bohländer - 2014 - European Journal of Organic Chemistry - Wiley Online Library. <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ejoc.201403119>.
29. Akchurin, I. O., Yakhutina, A. I., Bochkov, A. Y., Solovjova, N. P. & Traven, V. F. Synthesis of novel push-pull fluorescent dyes – 7-(diethylamino)furo[3,2-c]coumarin and

- 7-(diethylamino)thieno[3,2-c]coumarin derivatives. *Heterocycl. Commun.* **24**, 85–91 (2018).
30. Mattingly, P. G. Mono-Protected Diamines. N $\alpha$ -tert-Butoxycarbonyl  $\alpha,\omega$ -Alkanediamine Hydrochlorides from Amino alcohols. *Synthesis* **1990**, 366–368 (1990).
31. Impact of  $\gamma$ -Amino Acid Residue Preorganization on  $\alpha/\gamma$ -Peptide Foldamer Helicity in Aqueous Solution | Journal of the American Chemical Society.  
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.6b06177>.
32. George, N., Ofori, S., Parkin, S. & Awuah, S. G. Mild deprotection of the N-tert-butyloxycarbonyl (N-Boc) group using oxalyl chloride. *RSC Adv.* **10**, 24017–24026 (2020).
33. Visible Light-Induced Borylation of C–O, C–N, and C–X Bonds | Journal of the American Chemical Society. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.9b12519>.
34. Jang, Y. J., Mulay, S. V., Kim, Y., Jorayev, P. & Churchill, D. G. Nerve agent simulant diethyl chlorophosphate detection using a cyclization reaction approach with high stokes shift system. *New J. Chem.* **41**, 1653–1658 (2017).
35. Berque-Bestel, I. *et al.* Synthesis and Characterization of the First Fluorescent Antagonists for Human 5-HT<sub>4</sub> Receptors. *J. Med. Chem.* **46**, 2606–2620 (2003).
36. Stubbing, L. A., Li, F. F., Furkert, D. P., Caprio, V. E. & Brimble, M. A. Access to 2-alkyl chromanones via a conjugate addition approach. *Tetrahedron* **68**, 6948–6956 (2012).
37. Wen, S.-S., Wang, J., Luo, Y.-M. & Yang, H. Synthesis of functionalized chromones via organocatalysis. *Tetrahedron* **70**, 9314–9320 (2014).
38. Huang, J., Jiang, Y., Li, J., Huang, J. & Pu, K. Molecular Chemiluminescent Probes with a Very Long Near-Infrared Emission Wavelength for in Vivo Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 3999–4003 (2021).

39. Majetich, G., Hicks, R. & Reister, S. Electrophilic Aromatic Bromination Using Bromodimethylsulfonium Bromide Generated in Situ. *J. Org. Chem.* **62**, 4321–4326 (1997).
40. Ke, X.-S., Tang, J., Chen, J.-J., Zhou, Z.-Y. & Zhang, J.-L.  $\beta$ -Ionic Conjugated Chlorin-Type Photosensitizers Based on Porpholactone: Synthesis, Photophysical Properties, and Photodynamic Activity. *ChemPlusChem* **80**, 237–252 (2015).