

Rodaminalapú, fotoindukált elektrontranszfer mechanizmus elvén működő feszültség szenzor molekulák fejlesztése

Horváth Zsófia

Országos Tudományos Diákköri dolgozat

Külső konzulens:

Dr. Cseri Levente

kutató vegyész

Belső konzulens:

Dr. Kupai József

habil. egyetemi docens

Femtonics Kft., Kémia Osztály

BrainVisionCenter Kutatóintézet és Kompetenciaközpont, Kémia Osztály

Budapest Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Utolsó módosítás: 2024.05.22.



Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék óriási köszönetet mondani témavezetőmnek, **dr. Cseri Leventének** a szakma rejtelmeinek átadásáért, értékes tanácsaiért és a rengeteg dologért, amit tőle tanulhattam. Köszönöm, hogy szakmai és emberi támogatásával hozzájárult a fejlődésemhez és ennek a munkának a létrejöttéhez.

Szeretném kifejezni hálámat belső témavezetőmnek, **dr. Kupai Józsefnek**, aki nélkül nem lehetnék ott, ahol vagyok. Köszönöm a kapott lehetőségeket, a szakmai tanácsokat és a támogatást.

Külön köszönet **dr. Mucsi Zoltánnak** a BrainVisionCenter Kémia osztályának vezetőjének, hogy a kutatócsoport tagja lehetek, valamint a szakmai tanácsaiért és segítségéért. Köszönöm **dr. Kovács Ervin** biztatását, támogatását és a hasznos szakmai tanácsait.

Köszönettel tartozom **Pantl Orsolyának** és **Csomos Attilának** a labormunkában nyújtott segítségükért, valamint társaságukért, melynek köszönhetően mindig örömmel telt a munka. Ezenkívül köszönöm a kutatócsoport további tagjainak segítőkészségét és kedvességét.

Szakmai segítségükért köszönetet érdemel **dr. Bogdán Dóra** és **dr. Turczel Gábor** az NMR felvételek elkészítéséért, a HR-MS mérések elvégzéséért **dr. Váradi Csaba**, a patch-clamp mérések elvégzéséért **Mihály Anna** és **Lányi Réka**, a HEK sejtekért a BrainVisionCenter molekuláris biológia osztálya.

A „Development and mechanistic study of DNS dyes” (projektvezető: dr. Kovács Ervin, ELKH Természettudományi Kutatóközpont) projekt nevében köszönetet mondunk az ELKH Cloud (lásd: Héder et al. 2022; <https://science-cloud.hu/>)¹ használatáért, ami hozzájárult a publikált eredmények eléréséhez.

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi áttekintés.....	9
1.1. A fluoreszcein és a rodaminvázas vegyületek.....	9
1.2. Ca^{2+} -szenzorok.....	10
1.3. Feszültség-szenzorok.....	11
1.3.1. Kismolekulás fluoreszcens feszültség-szenzorok története	11
1.3.2. PeT elven működő kismolekulás feszültség-szenzor festékek.....	16
1.3.3. Fehérjealapú feszültség-szenzorok	27
1.4. Hibrid feszültség-szenzorok.....	28
1.5. Feszültség-szenzorok tesztelése	30
1.6. A szenzorok optimalizálása kvantumkémiai számítások segítségével.....	32
2. Célkitűzések	33
3. Kísérleti eredmények és diszkusszió.....	35
3.1. Irodalmi reprodukció	35
3.2. Eltérően szubsztituált donort tartalmazó feszültség-szenzor festékek horgonyrészének szintézise.....	37
3.3. A feszültség-szenzor fluorofór részének szintézise	41
3.4. A feszültség-szenzor intermedierek kapcsolása Heck-reakcióval.....	43
3.5. Feszültség-szenzor molekulák tesztelési módszerének fejlesztése.....	47
3.6. Biológiai tesztelés HEK sejtek segítségével.....	49
3.7. Feszültség-szenzorok fotokémiai tulajdonságainak vizsgálata kvantumkémiai számítások segítségével.....	51
4. Jövőbeni tervek	56
5. Kísérleti munka.....	57
5.1. A kísérletek során használt vegyszerek, eszközök és műszerek.....	57
5.2. A reakciók elvégzésének részletes leírása	58
5.2.1. <i>N,N</i> -Dietyl-3-metoxi-4-vinilánilin.....	58
5.2.2. (<i>E</i>)-4-(4-(Diethylamino)-2-metoxisztiril)benzaldehyd.....	59
5.2.3. (<i>E</i>)- <i>N,N</i> -Dietyl-3-metoxi-4-(4-vinilsztiril)ánilin	59
5.2.4. 4-Bróm-2-formilbenzoesav	60
5.2.5. 4-Bróm-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3 <i>H</i> -xantén-9-il)benzoát	61
5.2.6. 4-((<i>E</i>)-4-((<i>E</i>)-4-(Diethylamino)-2-metoxisztiril)sztiril)-2-(6-(dimethylamino)-3-(dimethyliminio)-3 <i>H</i> -xantén-9-il)benzoát.....	61
5.2.7. 8-Metoxi-2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -pirido[3,2,1- <i>ij</i>]kinolin-9-karbaldehyd.....	62
5.2.8. 8-Metoxi-9-vinil-2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -pirido[3,2,1- <i>ij</i>]kinolin	62
5.2.9. (<i>E</i>)-4-(2-(8-Metoxi-2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -pirido[3,2,1- <i>ij</i>]kinolin-9-il)vinil)benzaldehyd ..	63
5.2.10. 8-Metoxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -pirido[3,2,1- <i>ij</i>]kinolin-9-karbaldehyd..	63
5.2.11. 8-Metoxi-1,1,7,7-tetrametil-9-vinil-2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -pirido[3,2,1- <i>ij</i>]kinolin	64
5.2.12. (<i>E</i>)-4-(2-(8-Metoxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -pirido[3,2,1- <i>ij</i>]knolin-9-il)vinil)benzaldehyd.....	65
5.2.13. (<i>E</i>)-8-Metoxi-1,1,7,7-tetrametil-9-(4-vinilsztiril)-2,3,6,7-tetrahydro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -pirido[3,2,1- <i>ij</i>]kinolin	65
5.2.14. 4-(9 <i>H</i> -Karbazol-9-il)-2-metoxibenzaldehyd.....	66
5.2.15. 9-(3-Metoxi-4-vinilfenil)-9 <i>H</i> -karbazol	67
5.2.16. (<i>E</i>)-4-(4-(9 <i>H</i> -Karbazol-9-il)-2-metoxisztiril)benzaldehyd	67

5.2.17.	(E)-9-(3-Metoxi-4-(4-vinilstiril)fenil)-9H-karbazol	68
5.2.18.	4-Bróm-2-formilbenzolszulfonát	69
5.2.19.	2-(Bisz(4-(dimetilamino)-2-hidroxifenil)metil)-4-brómbenzolszulfonát	69
5.2.20.	4-Bróm-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xantén-9-il)benzolszulfonát	70
5.2.21.	4-((E)-4-((E)-4-(Dietilamino)-2-metoxisztiril)sztiril)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xantén-9-il)benzolszulfonát	72
5.2.22.	2-(6-(Dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xantén-9-il)-4-((E)-4-((E)-2-(8-metoxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-pirido[3,2,1-ij]kinolin-9-il)vinil)stiril)benzolszulfonát	73
5.2.23.	4-((E)-4-((E)-4-(9H-Karbazol-9-il)-2-metoxisztiril)sztiril)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xantén-9-il)benzolszulfonát	74
5.2.24.	2-(6-(Dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xantén-9-il)-4-((E)-4-((E)-2-(8-metoxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-pirido[3,2,1-ij]kinolin-9-il)vinil)stiril)benzoát	75
5.2.25.	4-((E)-4-((E)-4-(9H-Karbazol-9-il)-2-metoxisztiril)sztiril)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xantén-9-il)benzoát	76
5.2.26.	N-(9-(2-((2-Amino-2-oxoetil)(2-szulfóetil)karbamoil)-5-((E)-4-((E)-4-(dietilamino)-2-metoxisztiril)stiril)fenil)-6-(dimetilamino)-3H-xantén-3-ilidén)-N-metilmetánaminium	77
5.2.27.	2-(N-(2-Amino-2-oxoetil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xantén-9-il)-4-((E)-4-((E)-2-(8-metoxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-pirido[3,2,1-ij]kinolin-9-il)vinil)sztiril)benzamido)etán-1-szulfon	78
5.2.28.	2-(4-((E)-4-((E)-4-(9H-Karbazol-9-il)-2-metoxisztiril)sztiril)-N-(2-amino-2-oxoetil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanén-9-il)benzamido)etán-1-szulfonát	78
5.3.	Liposzómás tesztelésekhez alkalmazott műszerek és oldatok elkészítésének részletes leírása	79
5.3.1.	Méréshez szükséges segédanyagok elkészítése	79
5.4.	A HEK sejtes tesztelés részletes leírása	80
5.5.	Kvantumkémiai számítások részletes leírása	81
6.	Összefoglalás	83
7.	Irodalomjegyzék.....	86

Jelölések és rövidítések jegyzéke

ACES:	<i>N</i> -(2-acetamid)-2-aminoetánszulfonsav
BeRST1:	Berkeley Red Sensor of Transmembrane Potential
BAPTA:	1,2-bisz(o-aminofenoxi)etán- <i>N,N,N',N'</i> -tetraecetsav
BLM:	fekete lipid membrán
CaM:	kalmodulin
ChR2:	Channel Rhodopsin 2
COMU:	(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidénaminooxi)dimetilamino-morfolino-karbénium hexafluorofoszfát
D:	tömeghiba
DFT:	sűrűség funkcionális elmélet
DIPEA:	diizopropil-etilamin
DKM:	diklórmétán
DMF:	dimetilformamid
DMSO:	dimetilszulfoxid
DOPC:	1,2-dioloil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfatidilkolin
DOPE:	1,2-dioloil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfatidiletanolamin
EGTA:	etilénglikol-bisz(β -aminoetiléter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraecetsav
FRET:	Förster-rezonancia energiatranszfer
fVF:	fluorene VoltageFluor
GEVI:	genetikailag kódolt feszültség indikátor
GFP:	zöld fluoreszcens fehérje
HATU:	hexafluorofoszfát-azabenzotriazol-tetrametilurónium
HEPES:	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav
HOMO:	legmagasabb energiaszintű betöltött molekulapálya
HPLC:	nagynyomású folyadék kromatográfia
HVI:	hybrid voltage indicator
LUMO:	legalacsonyabb energiaszintű betöltetlen molekulapálya
M13:	miozin könnyűlácú kináz
MS:	tömegspektroszkópia
MW:	molekula tömeg
NMR:	mágneses magrezonancia-spektroszkópia
PEG:	polietilénglikol

PeT:	fotoindukált elektrontranszfer
poRhoVR:	phosphine-oxid Rhodamine Voltage Reporter
pTSA:	<i>para</i> -toluolszulfonsav
R _f :	retenciós faktor
RhoVR:	Rhodamine Voltage Reporter
sRhoVR:	sulfoRhodamine Voltage Reporter
SuRhoVR:	Sulfonated Rhodamine Voltage Reporter
szh:	szobahőmérséklet
TEA:	triethylamin
TFA:	trifluorecetsav
THF:	tetrahydrofuran
TPA:	kétfoton abszorpció
VF:	VoltageFluor
VRK:	vékonyréteg kromatográfia

Bevezetés

Mind az állatok szervezete, mind az emberi test egy rendkívül komplex, mindenki által csodált rendszer, amelynek működését már korai elődjünk is szeretnék volna alaposabban megismerni. Bár a biológia tudományága már eddig is lenyűgöző fejlődéseket ért el, de az élő szervezet összetettsége még ma is számos titkot rejt. Ezen belül kiemelkedik a neurobiológia, amely az idegrendszer felépítésével és működésével foglalkozó tudományág. Szerepe különösen fontos az érzékelés, gondolkodás és egyéb alapvető emberi tevékenységek kialakításában.² Az neurológiai betegségek gyógyításának fejlődéséhez elengedhetetlen az egészséges és sérült idegsejtek működésének alaposabb megismerése. Az erre irányuló kutatások hosszútávon különböző terápiás kezelések és gyógymódok alkalmazásához is hozzájárulnak.

Szervezetünk működése során a sejtek számos iontranszportot bonyolítanak, amely kiegyenlítetlen ion koncentrációkat okoz a sejthártya két oldala között. Ennek hatására a sejtmembránban kialakul egy feszültség, melyet transzmembránpotenciálnak nevezünk.³ A neuronok igen bonyolult működésének fenntartásához akár 1-100 ms gyorsasággal változtatják meg ezt az értéket.⁴ Ahhoz, hogy jobban megismerhessük az idegsejtek működését szükségünk van egy módszerre, ami képes ilyen gyorsasággal lekövetni a feszültségek változását.

A membránpotenciál mérése hagyományos módszerekkel nagyon limitált. A legtöbbször alkalmazott módszer a „patch-clamp” technika, mely során egy üvegpipettával lefedünk egy ioncsatornát, ezáltal működése során mérni tudjuk az ionok vándorlását és a létrejött potenciálértékeket. Azonban a módszer invazív, kivitelezése nagy jártasságot igényel, valamint kevés információt tud szolgáltatni a vizsgált folyamatok időskáláján. Ezenkívül alkalmaznak még multielektrodos méréseket is, amelyek segítségével már lehetőség van egyszerre több helyen is vizsgálni a kívánt értékeket, azonban arra továbbra sem alkalmas, hogy definiáljuk a mért folyamatok végbemenetelének pontos helyét.⁴

A mikroszkópos képalkotás vonzó lehetőséget jelent, azonban ehhez különböző segédanyagok szükségesek, amelyek a membránpotenciál változásának hatására mikroszkóppal mérhető jeleket generálnak. Ilyen célból hozták létre a feszültségszenzor molekulákat.⁵ Ezeknek több típusa ismert már, beszélhetünk fehérjealapú, hibrid és kismolekulás fluoreszcens szenzorokról. Az utóbbi csoport legkiemelkedőbb tagjai például a

merocianin,⁶ a rodamin,⁷ fluoreszcein alapú vegyületek, valamint különböző elektrokróm festékek.^{8,9,10}

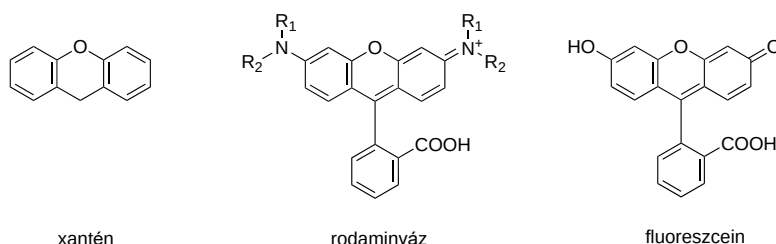
Az első membránpotenciálfüggő festéket az 1970-es években fedezték fel,¹¹ azonban a kutatási téma csak a 2010-es években vált újra népszerűvé, mivel a mikroszkópok fejlődése lehetőséget ad a feszültség-szenzor molekulákban rejlő lehetőségek kiaknázására. Egy szenzor molekula kifejlesztése számos kihívással jár, mivel rengeteg feltételnek kell megfelelnie.¹² Milliszekundum nagyságrendű gyorsasággal kell reagálnia a membránpotenciál változásra,¹³ melynek hatásaként meg kell változnia a fluoreszcencia intenzitásának. Olyan információt kell szolgáltatnia a potenciál értékeken keresztül mely segítségével feltérképezhető, hogy a neuronok hogyan alakítják ki a kimeneti jelüket a bemeneti jelükből kiindulva.^{14,15}

A kutatócsoportunk már évek óta biológiai kutatásokhoz hasznosított fluoreszcens festékek fejlesztésén dolgozik. Témavezetőm 2021 óta foglalkozik feszültség-szenzor molekulák működésével és fejlesztésével, mely kutatáshoz én is csatlakoztam 2022-ben. Dolgozatomban új, fotoindukált elektrontranszfer (PeT) mechanizmus elvén működő kismolekulás rodaminvázas feszültség-szenzor festékek szintézisét és tesztelését mutatom be.

1. Irodalmi áttekintés

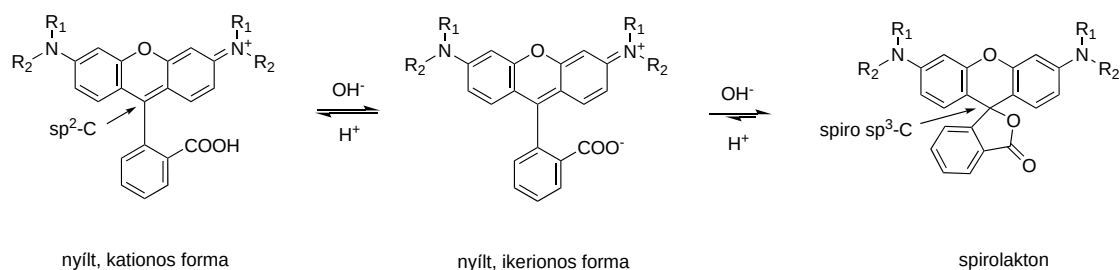
1.1. A fluoreszcein és a rodaminvázis vegyületek

A legjobban elterjedt fluoreszcens vegyületek alapját a xantén-váz (1. ábra) adja, mely a kialakuló konjugáció és merev szerkezete révén kiváló fluoreszcens tulajdonságot kölcsönöz a molekuláknak. A rodaminvázis¹⁶ vegyületeket, valamint a fluoreszceint¹⁷ (1. ábra) széles körben alkalmazzák fluoreszcens tulajdonságaiknak, magas kvantumhatékonyságainak és kiemelkedő fotostabilitásuknak köszönhetően.



1. ábra: A széleskörben elterjedt fluoreszcens vegyületek, a xantén, a rodaminváz és a fluoreszcein felépítése

A rodaminvázis vegyületek különleges tulajdonsága, hogy változó pH hatására színváltozáson mennek át, mely egy gyűrűzárásnak, spirociklizációnak köszönhető (2. ábra). A színváltozás alapja, hogy a gyűrűzárt forma egy spiro-sp³ szénatomot tartalmaz, míg a nyílt ikerionos forma egy sp² hibridállapotú szenet. A spiro-szénatom megszünteti a xantén-vázban lévő konjugációt, ezáltal a molekula nem mutat abszorpciót és emissziót a látható tartományban. A nyílt formában a HOMO és LUMO molekulapályák közötti energiakülönbség lecsökken, ezek miatt a vegyület erős abszorbanciát mutat a látható régióban.¹⁸



2. ábra: A rodaminvázis vegyületek pH függő spirociklizációja, melynek hatására a nyílt kationos forma egy nem fluoreszcens spirolakton formává alakul

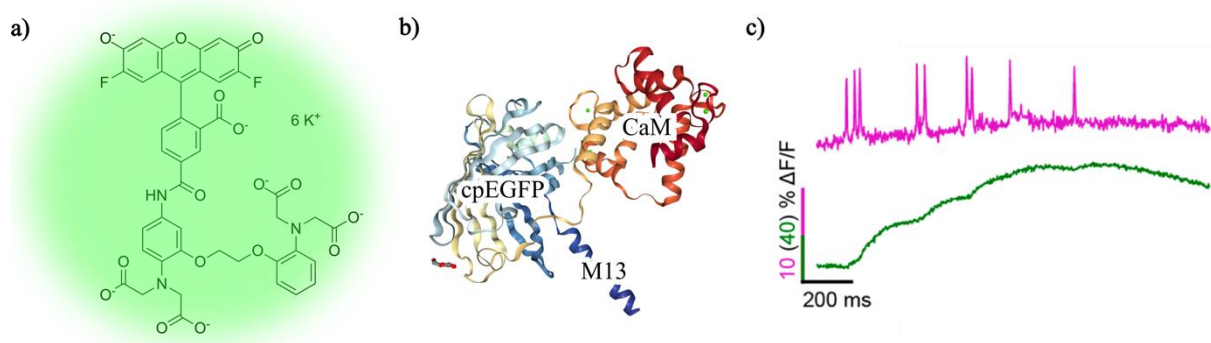
A fluoreszcein és származékai esetében is megfigyelhető egy pH függő gyűrűzárás, mely során egy gyűrűzárt lakton vagy egy nyílt, kinoid forma alakul ki.¹⁹ Ezenfelül a molekula

számos formát hoz létre különböző kémhatású közegekben, létezik kationos, semleges, anionos és dianionos formája is.¹⁷ Ezek által a fluoeszcein fluoeszenciája jelentősen függ a közeg pH-jától. Kiemelkedő tulajdonságai révén már régóta alkalmazzák és vizsgálják tulajdonságait, ezért néhány származéka kereskedelmi forgalomban is kapható, valamint könnyen, jó termeléssel állítható elő.¹⁹

1.2. Ca^{2+} -szenzorok

A Ca^{2+} -szenzorok olyan vegyületek, melyek szelektíven a kalciumion koncentráció változásának hatására változtatják a fluoeszccens tulajdonságaikat, melyet mikroszkópiás képalkotás segítségével nyomon lehet követni. Két típusát különböztetjük meg, a kémiai kismolekulás (pl. OregonGreen BAPTA), valamint a genetikailag kódolható kalciumion-szenzorokat (pl. GCaMP) (**3. ábra**). A kémiai festék működésének alapelve, hogy kelát komplexet képeznek a kalcium ionnal.

A genetikailag kódolható kalciumszenzorok tulajdonságaik révén alkalmasak lehetnek az elektromos aktivitás feltérképezésére is, mivel a sokévnnyi kutatómunka eredményeképp magas fejlettségi szintűek, nagy érzékenységgel mutatják a potenciálváltozás hatására történő Ca^{2+} koncentráció változást (**3. ábra**).^{20,21} Ezek a vegyületek genetikailag kódolhatók, ezáltal előre specifikált sejtek működésének vizsgálatához is alkalmasak.²² Bár az ionaktivitás mérése alapján információt nyerhetünk a sejtekben végbemenő potenciálváltozásokról, azonban a neuronok működése rendkívül komplex. A depolarizációt követően több folyamaton keresztül alakítják ki a Ca^{2+} jeleket, ezáltal ennek a jelnek a mérése nem ad pontos információt az akciós potenciál értékeinek változásáról, működéséről.²³ Ezenfelül a szenzorok csak több száz milliszekundum nagyságrendű válaszüddővel rendelkeznek, amely többszöröse a vizsgálni kívánt biológiai folyamatok időskálájához képest.²⁴ További különbség, hogy a kalciumion szintet az intracelluláris médiumban mérik, míg a membránpotenciált a membránban.



3. ábra: a) Az OregonGreen BAPTA szerkezete; b) A GCaMP3 Ca^{2+} -szenzor ábrája,²⁵ melynek részei a cirkulárisan permutált GFP (cpEGFP), a kalmodulin (CaM), mely egy kalciumkötő fehérje, a miozin könnyűlánc kináz (M13), mely egy szerin/treonin specifikus protein kináz; c) Egy GCaMP6 szenzorral mért Ca^{2+} (zöld) és egy RhoVR1-PEG₂₅-Halo segítségével mért feszültségjel (rózsaszín) összehasonlítása (Az eredeti ábra felhasználása a szerzők engedélyével²⁶. Copyright 2020 American Chemical Society)

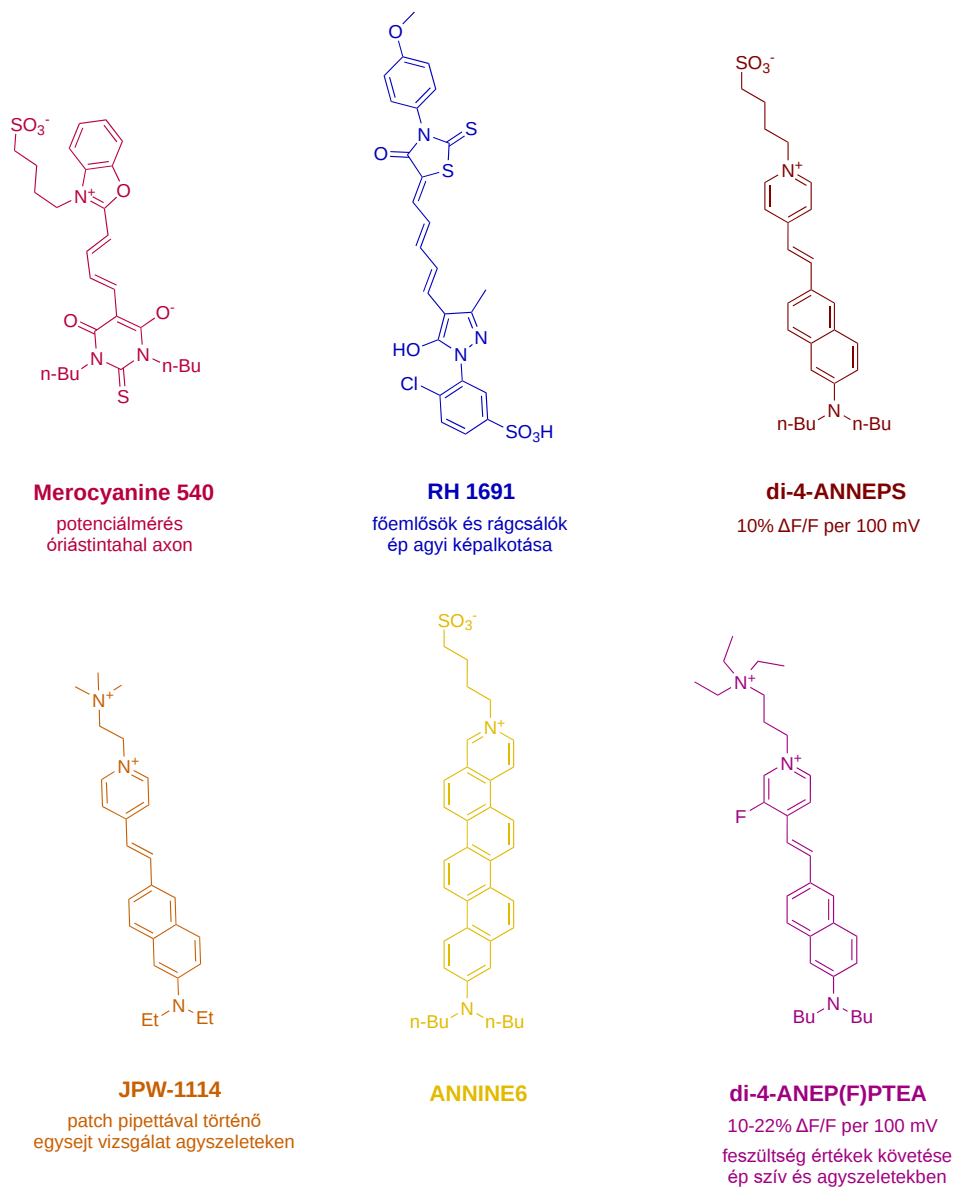
1.3. Feszültség-szenzorok

1.3.1. Kismolekulás fluoreszcens feszültség-szenzorok története

A kismolekulás vegyületek vonzó tulajdonsága, hogy fluoreszcenciájuk gyors változtatása révén alkalmasak lehetnek a membránpotenciál változásainak hatására érzékeny, pontos jeleket generálni. Az első kismolekulás feszültség-szenzort 1973-ban állították elő Larry Cohen és munkatársai. Számos molekula előállítását és vizsgálatát végezték el, valamint a legígéretesebb molekulák tesztelését tintahal óriás axonon végezték el, mely eredményeképpen azt találták, hogy a legkiemelkedőbb fluoreszcenciával és jel-zaj viszonytal rendelkező molekula a merocianinok családjába tartozó Merocyanine 540 volt (**4. ábra**).¹¹

A feszültség-szenzorok működése többféle mechanizmussal történhet, melyek közül a leghamarabb a molekuláris Stark-effektust (**5. ábra**) vizsgálták. Az effektus lényege, hogy az idegi működés közben létrejött elektromos tér erő változásának hatására megváltozik a szenzor kromofór dipólusának energiaszintje, amely változást hoz létre az abszorpciós és az emissziós spektrumban. A szenzor érzékelésének gyorsasága még a membránpotenciál változás sebességétől is nagyságrendekkel nagyobb, ezáltal alkalmassá teszi az adott vegyületet feszültségérzékelési feladatra. Az eltolódás optikai képalkotás során detektálható, azonban mivel kismértékű (<10 nm), ezért csak nagyon pontos műszerbeállítások mellett mérhető

megfelelően.⁴ Az ilyen elven működő feszültségsszenzorokat elektrokróm festékeknek nevezzük. Legjelentősebb képviselőiként négy molekulát említenék, a di-4-ANNEPS,²⁷ a JPW-1114,²⁸ az ANNINE6²⁹ elnevezésű festéket, melyek sztiril-vázás vegyületek, valamint az oxonol alapú RH 1691³⁰ molekulát.



4. ábra: Kismolekulás feszültségsszenzorok szerkezete, feszültségérzékenysége és biológiai alkalmazhatóságuk

Az elektrokróm festékek csoportjába tartozó legszélesebb körben elterjedt szenzor a di-4-ANNEPS (**4. ábra**), amely egy amino-naftil-etilén-piridinium-propilszulfonát, melyet először Leslie Loew és kutatócsoportja állított elő. A molekula felosztható két eltérő poláris és hidrofíll láncvégre. A hidrofíll vég egy ikerionos szerkezetet tartalmaz, amely egy konjugált láncon

keresztül kapcsolódik a lipofil anilinhez. Egy hasonló származék a di-8-ANNEPS, amely csak az anilin szubsztitúciójában tér el.²⁷

Mivel a festékek alkalmazását élő szervezetben szeretnék megvalósítani, ezért előnyös, ha a molekula vizes közegben is oldódik. Ennek céljából előállították a di-4-ANNEPS egy vízdoldhatóbb származékát is, melyben a szulfonát-csoportot kvaterner ammónium sóval helyettesítették a vízdoldhatóság növelése érdekében. A JPW-1114 egy zöld és kék elnyelésű intracelluláris alkalmazásra szánt festék (**4. ábra**). Egy továbbfejlesztett változata a JPW-3080, melynek elnyelése és emissziója vöröselölt, ezáltal a gerjesztési spektruma kevésbé fed át a sejtek abszorpciójával, aminek hatására csak kevésbé befolyásolja a sejtek normál működését, így elkerülhetjük a hamis információk gyűjtését. Az új származék nem csak érzékenységben múlta felül elődjét, hanem toxicitásban is alacsonyabb értékeket mutatott.²⁸

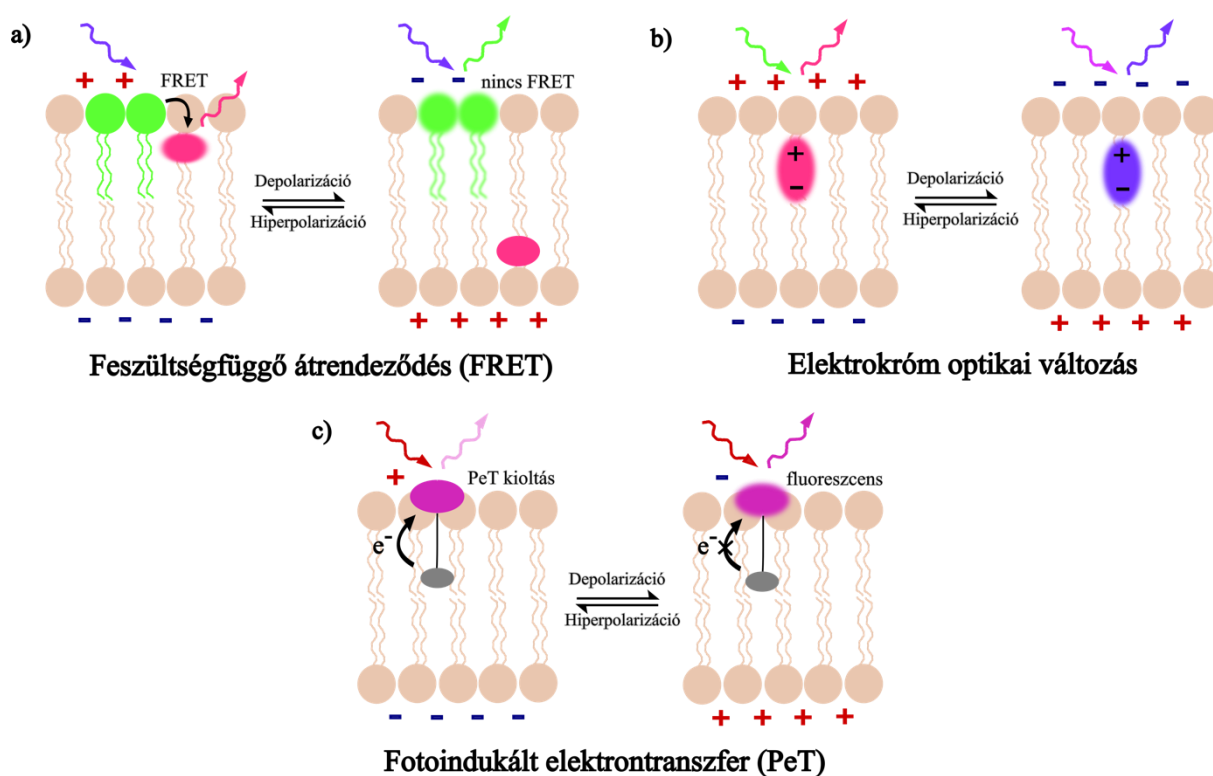
Az utolsó sztiril-vázas feszültségsszenzor az ANNINE6 (**4. ábra**), mely egy kiterjedt konjugációt tartalmazó hemicianin alapú festék. A kifeszített π -rendszer növeli a kromofór dipólusát, ezáltal a molekula Stark-effektusa is növekedni fog, így a festék feszültségérzékelési tulajdonságai is javulnak az előző származékokhoz képest.⁴ A hemicianin váz szubsztitúciója során azt találták, hogy a fluorozott származékok jelentős javulást mutatnak fotostabilitásban, széles hullámhossztartományban alkalmazhatók (**4. ábra**). A festéket a JPW-1114 analógiájára egy kvaterner ammónium fejcsoporttal látták el a jobb vízdoldhatóság érdekében, valamint, hogy csökkentse a festék áthaladását a membránon. További kiemelkedő tulajdonságuk a kétfoton mikroszkópiás alkalmazhatóságuk.³¹

Rina Hildesheim és Amiram Grinvald kutatási munkájuk során oxonol alapú feszültségsszenzor molekulákkal foglalkoztak, melyek közül a legismertebb az RH1691 lett, mely ma is széleskörben elterjed (**4. ábra**). A molekula infravörös elnyelési spektrumú, ezáltal a fentebb említett előny, hogy kevésbé befolyásolja alkalmazás közben a sejtek normál működését, az ebben az esetben is igaz lesz.³⁰

Az eddig említett molekulák a gyors válasz idejű festékek csoportjába sorolhatók, ami felveszi a versenyt a vizsgálni kívánt folyamatok időskálájával, azonban feszültség érzékenységük nem túl kiemelkedő. A szenzorok egy másik csoportja a lassú válasz idejű festékek, melyeknek pont az érzékenységük az előnyük, míg lassúságuk ellehetetleníti használatukat. Azonban a lassú válasz idejű festékek nagy feszültségérzékenysége miatt új utakat kerestek felhasználásuk érdekében. Amennyiben kombináljuk őket egy helyhez kötött

fluorofórhoz akkor egy Förster-rezonancia energiatranszfer (FRET) elvén működő (5. ábra) feszültség-szenzor molekulát kaphatunk. A mechanizmus működésének elve, hogy egy lipofil anion a kialakuló membránpotenciál függvényében fog eloszlani a membrán két oldalán. Két fluorofór szükséges a folyamat végbemeneteléhez egy helyhez kötött (zöld), valamint egy mobil fluorofór (rózsaszín), mely lehet egy lassú válasz idejű festék. A potenciál megváltozásának hatására a mobil csoport tulajdonságai változnak, ezáltal pedig az elektrontranszfer mértéke is, így a kioltás nagysága is.⁴

Az eddigiekben három jelentősebb mechanizmust említettem, mely szerepet játszik a feszültség-szenzorok működési elvében, a Stark-effektust, vagy másnéven elektrokróm eltolódást, a szolvatokróm választ, valamint a FRET effektust. A számomra legjelentősebb azonban a fotoindukált elektrontranszfer (PeT) (5. ábra) lesz, amely elven működő szenzorokat én is előállítottam.

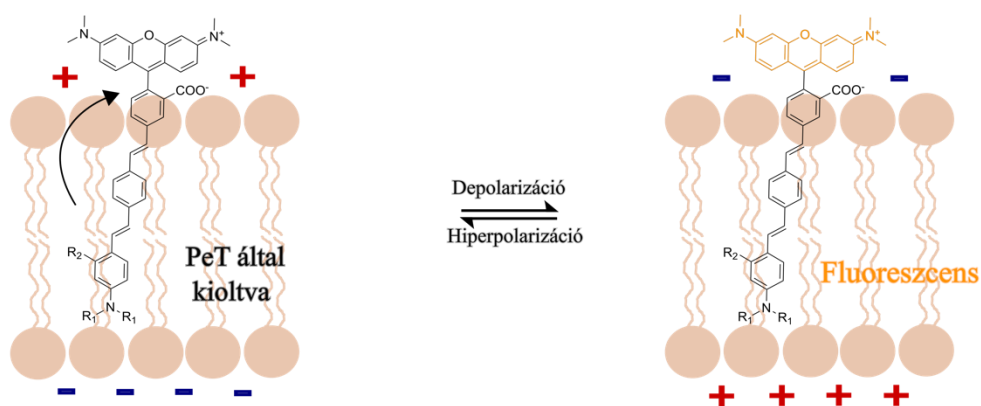


5. ábra: A feszültség-szenzor molekulák működési elveit bemutató egyszerűsített ábra, a) Förster rezonancia energiatranszfer, b) elektrokróm effektus, c) fotoindukált elektrontranszfer⁴

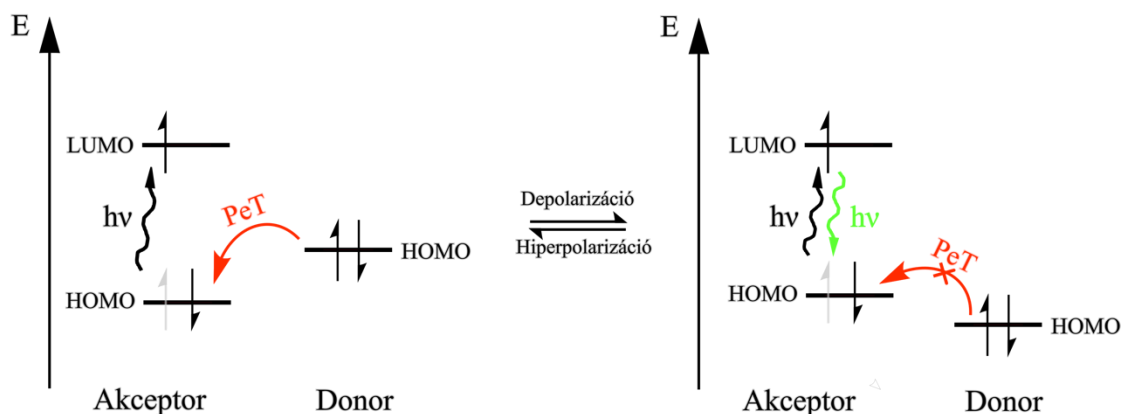
A fotoindukált elektrontranszfer (PeT) egy gerjesztett állapotú elektrontranszfer, mely során a fény energiájának hatására gerjesztés megy végbe, melynek köszönhetően megtörténik egy donor molekuláról egy akceptor molekulára az elektron átadás. Az akceptor gerjesztett állapotban van, ezáltal a HOMO pályája csak részben betöltött, ahova energiacsökkentés

érdekében a donor molekula elektront tud átadni (**6. ábra**). A feszültség-szenzor molekulák esetében az akceptor molekula lesz a fluorofór és a PeT mechanizmus lejátszódásának mértékét jelentősen befolyásolni fogja a feszültség nagysága. Ennek oka, hogy a PeT mechanizmus szerinti sugárzásmentes relaxáció és a fluoreszcencia verseng egymással. Ebből egyértelműen következik, hogy az egyik növekedése a másik csökkenését okozza és fordítva. A lipidmembrán külső oldalán lokalizálódott szenzor esetén a membrán hiperpolarizációjakor a PeT effektus nagysága megnő, ezáltal visszaszorítva a fluoreszcenciát. Ellentétes esetben depolarizációkor a feszültség csökkenti az effektust, ezáltal növeli a fluoreszcencia intenzitását (**6. ábra**).⁴ Az elektrontranszfer mértéke exponenciálisan csökken a távolsággal.

a)



b)



6. ábra: a.) A PeT mechanizmussal működő RhoVR festékek feszültségérzékelésének módja, ahol hiperpolarizáció esetén a PeT mechanizmus, míg depolarizáció esetén a fluoreszcencia lesz jellemző² b.) A fotoindukált elektrontranszfer mechanizmusa

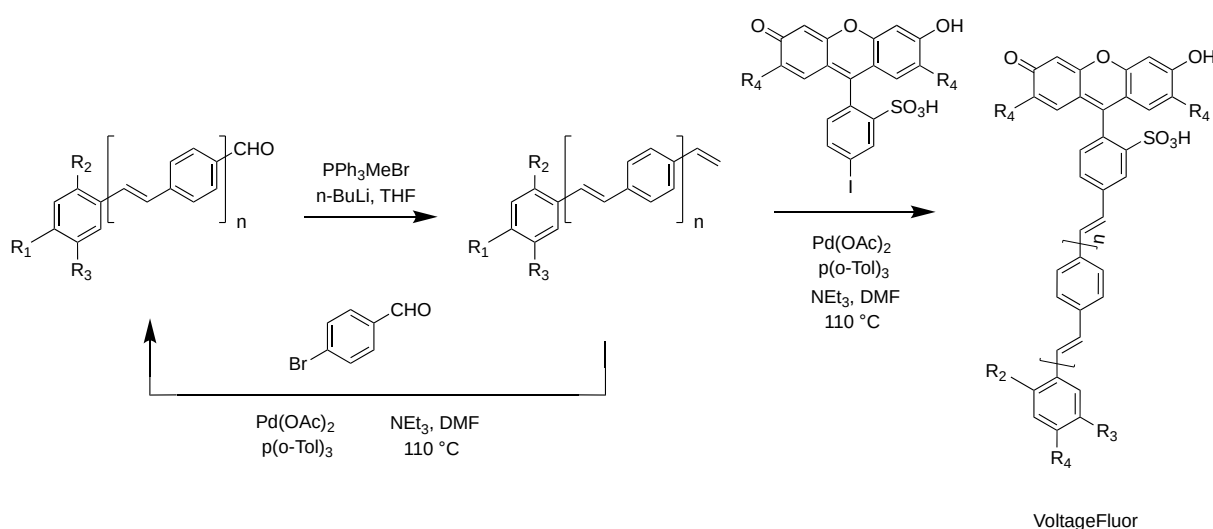
Az első PeT mechanizmus elvén működő festékek előállítása Evan W. Miller, a Nobel-díjas Roger Y. Tsien és munkatársaik munkájának köszönhető. Ezekről a későbbiekben bővebben lesz szó.

1.3.2. PeT elven működő kismolekulás feszültségsszenzor festékek

Az irodalomban leírt legjobban működő feszültségsszenzorok kezdetben az elektrokróm festékek voltak, ezáltal a PeT mechanizmussal működő szenzorok első leírásaiban gyakran olvashatunk a két festékcsoport összehasonlításáról. Az elektrokróm festékek legnagyobb előnye a gyorsaságuk,^{32,33} azonban ehhez szükséges, hogy a π -molekulapályák megfelelően átfedjenek, hiszen ezzel biztosítják a töltésvitelt, ezáltal a feszültségérzékeny fluoreszcenciát. Ez a szerkezet azonban megköveteli, hogy a teljes kromofórnak merev pozícióban kell lennie a vegyületen belül, amely általában jelentősen rontja a vízoldhatóságot. Emiatt kisebb a jelentőségük a jövőbeni alkalmazásra. Egy ilyen kromofór előállítás szintetikus problémákat is felvet,³⁴ amely magyarázhatja, hogy miért nem fejlesztették tovább az elektrokróm festékeket a 2000-es években. Ezzel szemben a PeT mechanizmus is fel tudja venni a versenyt a biológiai időskálával, azonban nagy előnyt jelent, hogy a gyors elektrontranszfer úgy jön létre, hogy ezalatt nem zavarja a sejt alapvető működését, nem változtatja meg a membránpotenciál értékét, így valós információk nyerhetők. Ezenfelül nem szükséges, hogy az egész molekula merev legyen.²³ Ezek a tulajdonságok indokolják a PeT szenzorok rohamos fejlődését a 2010-es évektől.

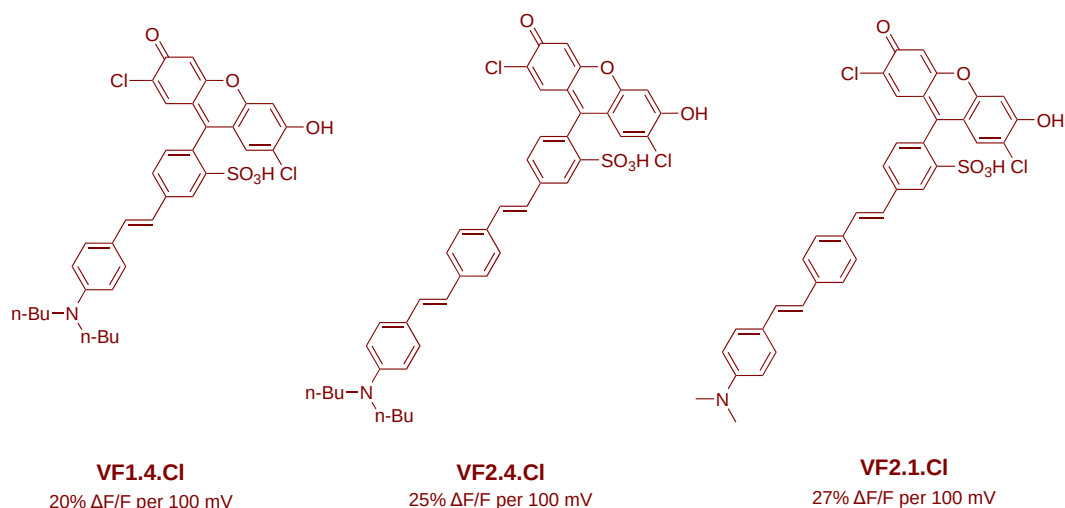
A PeT effektussal működő feszültségsszenzorok területén a legaktívabb az Evan W. Miller által vezetett kutatócsoport volt. A mechanizmus működéséből kiindulva szükséges egy donor molekularész, mely elektronban dús, ezáltal elektront tud szolgáltatni a transzferhez, valamint egy akceptor molekularészre, amely gerjesztett állapotba kerül, a HOMO pályáján csak egy párosítatlan elektron található, így a donor átadhatja neki elektronját.⁴ Azt is figyelembe kell venni, hogy az effektus erősen függ a távolságtól, ezért a két részt valamely módon egymáshoz kell rögzíteni. Ezek alapján a molekulák felépítését két részre tudjuk osztani, a festékrészre, amely a fluoreszcenciáért felelős, tehát az akceptor szerepébe lép, valamint a horgonyrészre, amely mind a donor szerepért, mind a két csoport rögzítéséért felelős. A festékek működésének egy másik alapfeltétele, hogy tudjanak lokalizálódni a plazmamembránban mivel, ha a membrán teljes elektromos teréről szeretnénk információt kapni, akkor a molekula hossz tengelyének merőlegesnek kell lennie a membrán síkjára. Mivel az elektrontranszfer egy vektor jellegű mennyiség ezáltal fontos lesz az iránya. Ha a feszültségsszenzorok nem a membrán egyik oldalán helyezkednek el, a feszültségjeleik ellentétes előjellel jelentkeznek, így kioltódnak.²³ Ezért is lényeges, hogy megfelelően a plazmamembránban lokalizálódjanak, amelyet a horgonyrész segítségével tudnak megtenni.

Az első így működő festékcsalád a VoltageFluor (VF) volt.²³ Előállításánál egy úgynevezett „fluorofór-lánc-donor” konstrukciót követtek. A fluorofór helyében szulfonsav-csoportot tartalmazó molekularész került, mely ionos karakterének köszönhetően megakadályozza, hogy a festék áthaladjon a membránon.² A donort és akceptort összekötő lánc szerepébe a fenilénvinilén-csoport került, amely nemcsak az effektus távolságtól való függését csökkenti,³² hanem tagja a donornak a dialkil-anilinhez kapcsolódva, ahol egy kiterjedt konjugációt hoz létre. Ezáltal biztosítja, hogy a donor HOMO pályájának energiaszintje magasabb legyen, mint az akceptor esetében és innen történjen az elektrontranszfer. A csoportra kiterjedt konjugációnak köszönhetően a PeT folyamatban résztvevő molekulapályák térben közelebb vannak, így nagyobb PeT effektus figyelhető meg.³⁵ A leírt szerkezet előállítása szintetikus kihívásokkal jár a szulfonsav-csoport jelenléte miatt, azonban a horgonyrész esetében tetszőleges hosszúságú lánc könnyen kialakítható egymást követő Wittig- és Heck-reakciók segítségével (7. ábra).²



7. ábra: A VoltageFluor festékek ($n = 0$ vagy 1) általános szintézise, ahol $n = 0$ kereskedelmi forgalomban kapható aldehidből indulnak ki

A festékek első generációja már kiemelkedő érzékenységet mutatott a korában, 20-27% $\Delta F/F$ per 100 mV értékkel, amely akár négyszerese a di-4-ANNEPS festékhez képest. Az előállított molekulák segítségével vizsgálták a donor szubsztitúciójának hatását a feszültségérzékenységre. A mért értékek alapján a fenilénvinilén-csoport hossza jelentősen befolyásolja a feszültségérzékenységet, míg ha a dialkil-amin butilcsoportokat tartalmaz, annak nagyobb elektronküldő hatása alig növeli az érzékenységet a metilcsoportokhoz képest (8. ábra).²³ A metilcsoportokat tartalmazó szenzor esetében jobb jel-zaj viszonyt mértek, mivel az jobban festi a sejtmembránt,² ezáltal erősebb fluoreszcenciát mérhetünk.



8. ábra: A VoltageFluor festékek 1.generációjának molekulái és feszültségérzékenységei, amelyen látható az eltérő hosszúságú fenilénvinilén-lánc, valamint az anilin szubsztitúciójának hatása a molekula feszültségérzékenységre

Az előállított festékek jelentős fejlődést jelentettek a tudományterületen. Ez elsősorban a PeT effektus alkalmazásának köszönhető, hiszen a depolarizáció, hiperpolarizáció hatására a molekulák nanoszekundum nagyságrendű gyorsasággal változnak, mely fluoreszcencia intenzitás változás lineáris a biológiailag releváns tartományban.⁴ Azonban az elkészített molekulák bizonyos tulajdonságai is hozzájárultak a sikerhez, például, hogy a membránban képesek lokalizálódni. Ezek alapján biológiai kísérleteket is végeztek velük, mely során alkalmasak voltak emlős neuronokban és *ex vivo* pióca kísérletek során az akciós potenciál nyomomonkövetésére.²³

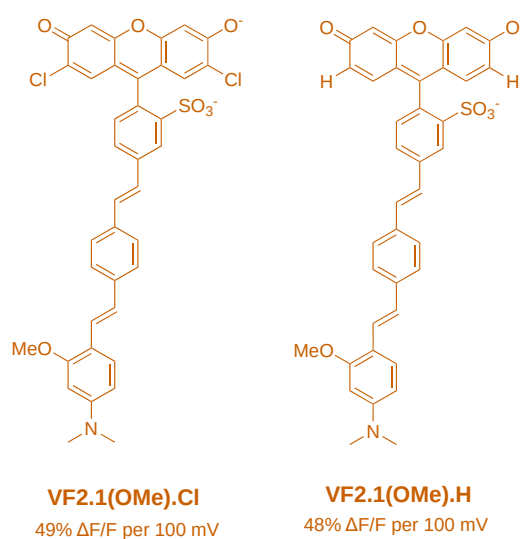
A festékek működésének alapja a fotoindukált elektrontranszfer működésének nagysága, ezáltal a mechanizmus hajtóerejének növelése segítségével növelhetjük a feszültség-szenzor molekulák érzékenységét. Ennek meghatározásáról több munkát is olvashatunk az irodalomban. Például C. R. Woodford és R. Y. Tsien kutatása,² mely során a kiszámított hajtóerők alapján következtettek a molekulák alkalmasságára és előállították a VF festékcsalád második generációját. A hajtóerő értékét a Rehm-Weller-egyenlet alapján **(1. egyenlet)**³⁶ számították:

$$\Delta G_{PeT} = \Delta E_{ox} - \Delta E_{red} - \Delta E_{0,0} - w \quad (1. \text{ egyenlet})$$

ahol ΔE_{ox} a donor oxidációs potenciálja; ΔE_{red} az akceptor redukciós potenciálja; $\Delta E_{0,0}$ az energia, amely szükséges a kromofór alapállapotból első gerjesztett állapotba kerüléséhez; w a

munka, amely megmutatja mekkora energia szükséges két töltés szétválasztásához. A w értéket konstansnak vették, hiszen a vizsgált molekulák szerkezetileg nagyon hasonlóak.²

Az egyenlet alkalmazásához mérniük kellett volna a donor és akceptor molekularészek redoxpotenciálját, azonban a rendkívül idő- és munkaigényes mérések elkerülése érdekében elhanyagolásokat alkalmaztak és csak a közelített ($\Delta G_{\text{PeT}} + w$) értékeket határozták meg. Ezek alapján a kapott feszültségérzékenységek csak kevésbé korreláltak a számított értékekkel, de néhány következtetést sikerült levonniuk, valamint kiemelkedő feszültségérzékenységgel rendelkező molekulákat létrehozniuk (**9. ábra**). A legnegatívabb összeget abban az esetben kapták, amikor a fluorofór molekularész elektronszívó csoportokat (Cl, F); míg a donor rész elektronküldő csoportokat (OMe, diOMe) tartalmazott. Ellentétes esetben a legmagasabb értékeket akkor számították, mikor a fluorofór elektronküldő (H, Me); a donor pedig semmilyen szubsztituenst nem tartalmazott. Ezelőtt a legjobb feszültségérzékenységgel rendelkező molekula 20 % $\Delta F/F$ per 100 mV értéket mutatott, ezért meghatározták a ($\Delta G_{\text{PeT}} + w$) azon tartományát, amely értékkel rendelkező molekulákkal efeletti feszültségérzékenységet mértek. Ez -0,08-tól -0,27 V-ig tartó tartománynak adódott.²



9. ábra: A PeT mechanizmus számolt hajtóereje alapján elvégzett predikció segítségével előállított legjobb feszültségérzékenységgel rendelkező második generációs VF festékek

A kifejlesztett festékek feszültségérzékenysége egyre jobban fejlődött az idő során, azonban érdemes megemlíteni egy fontos hátrányát is ezeknek a molekuláknak, mely szintúgy vonatkozik az összes kismolekulás szenzorra. Nem tartalmaznak genetikailag kódolt komponenst, ezáltal alkalmazásuk során nem csak a vizsgálni kívánt sejteket fogja megfesteni, ez jelentősen növeli a háttérfluoreszcenciát és csökkenti a jel zaj viszonyt. Ez a probléma

növekszik, ahogy a valós alkalmazáshoz egyre közelebbi tesztek végeznek, tehát a HEK sejtektől az agyszeletekig.²

A membránban való lokalizáció jelentősen befolyásolja a feszültségérzékenységet, ezért a festékek fejlesztése során próbálták vizsgálni ezt a tényezőt is molekuláris dinamika szimulációk segítségével. Egy emlős sejtmembránjának modelljeként lipid kettősréteget alkalmaztak, majd a teszteléseket a legjobb tulajdonságokkal rendelkező második generációs VF festéken végezték. Feltételezték, hogy a PeT mechanizmuson alapuló feszültségérzékelés egyenesen arányos az effektus hajtóerejével és ez alapján egy egyenletet írtak fel (**2. egyenlet**), amely a fiziológiailag releváns tartományban alkalmazható.³⁷ Munkájuk alapja a Leslie Loew által készített modell volt az elektrokróm festékekhez.^{38,39} Az egyenlet azon alapszik, hogy az elektrontranszfer és a potenciál közötti összefüggés abban az esetben a legnagyobb, ha vektoraik egymáshoz igazodnak, míg minimális ha merőlegesek egymásra.⁴⁰

$$\Delta F/F \propto \Delta G = q * r * E * \cos \theta \quad (2. \text{ egyenlet})$$

ahol $\Delta F/F$ a festék feszültségérzékenység növekménye, ΔG a hullámhossz eltolódáshoz kapcsolódó energiaváltozás, q az átvitt effektív töltés, r a q által megtett távolság, E az elektromos tér, és θ az elektronátviteli vektor és az elektromos térvektor közötti elmozdulás vagy dőlésszög.⁴⁰

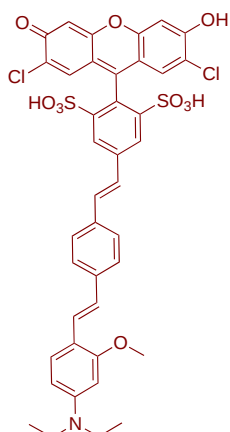
A modellezett molekula esetében megfigyelték, hogy elsősorban a víz/lipid határfelületen lokalizálódik, melynek oka lehet a nempoláris lipid és a töltéssel rendelkező szulfonát-csoport összeférhetetlensége. Mivel ilyen csoport csak a molekula egyik oldalán található ezért 35°-os szöget zár be a membránsík normálvektorával, és emiatt kisebb effektív térerősség változásokat érzékel. Ebből azt feltételezték, hogy a legnagyobb feszültségérzékelés úgy érhető el, ha a membránra merőleges a festék, tehát dőlésszöge nulla. Ez akkor lehetséges, ha a vegyület egyik oldal felől sem szeretne kapcsolatba lépni a lipid kettősréteggel,⁴⁰ valamint ha a molekula teljesen merev. Ez alapján a VF család legjobb tulajdonságú tagjainak előállították a diszulfonált származékaikat is, ahol a kromofór mezo-aril gyűrűjének másik orto pozíciójába is szulfonsav-csoport került (**10. ábra**).

A szintetizált feszültség szenzorok elnyelési (507–520 nm) és abszorpciósi (529–540 nm) spektrumuk csak kevésbé változott a monoszulfonált elődjeikéhez képest, azonban ezek a

vártak megfelelően jobban lokalizálódtak a plazmamembránban a HEK293T sejteken való alkalmazás során. Következtetések alapján a molekula merevségének növelésével a feszültségérzékenység növekedést vártak, amelyre az előállított molekulák megfelelő bizonyítékot jelentettek, átlagosan 16% emelkedést tapasztaltak⁴⁰ a monoszulfonált származékokhoz esetben.² A kiemelkedő érzékenység következtében új lehetőségek nyíltak a membránpotenciál vizsgálatában, mivel ezek segítségével abban az esetben is értékelhető eredményt kaphatunk, ha rossz a jel zaj viszony vagy valami rontja az érzékenységet. Például használható kisebb teljesítményű megvilágításnál, vastagabb sejtmintákon vagy hosszan tartó mérések során is. A molekula előállítása során megváltoztatták a dialkil-anilin alkil-csoportjának hosszát⁴⁰ az egyszerűbb szintézis érdekében, ezáltal a kereskedelmi forgalomban kapható *N,N*-diethylsalicylaldehydből tudtak kiindulni.

A feszültség szenzorok használatához elengedhetetlen a megfelelő mikroszkópai elemezhetőség, ezért is kerültek előtérbe a jobb kétfoton abszorpcióval rendelkező származékok, mint például a rodol-alapú kromofórt tartalmazó Rhodol VoltageFluor 5 (RVF5) (**10. ábra**). A vegyület egy- és kétfoton mérések alkalmával is jobb fotostabilitással működött, mint a VF festékek 1. generációja. A kétfoton mikroszkópia előnyös tulajdonságai alapján a szenzor széleskörben alkalmazható mélyebben fekvő sejteken, szöveti területeken és agyszelet mintákon.⁴¹

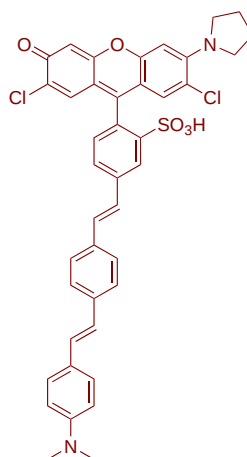
A PeT alapú feszültség szenzor molekulák egy másik problémája a fototoxicitás. Ennek csökkentésére tett kísérlet eredménye a Flourene VoltageFlour (fVF) család, melyben a fenilénvinilén egységet egy fluorén-csoporttal helyettesítették (**10. ábra**). A kapott molekulák kevésbé fototoxikusak ezáltal akár hosszabb ideig tartó mérések alkalmával is használhatók.⁴² A fenilénvinilén-csoport helyettesítésére kísérleteket tettek, de az drasztikusan csökkentette a molekulák feszültségérzékenységét.⁴³ Ebből feltételezték, hogy a csoport nem csak a donor és az akceptor összekötésében játszik szerepet, hanem a donor része és a fluorén csoporttal nem jön létre a PeT mechanizmus. Emiatt ötvözték a kettőt és a fluorén mellé egy vinilcsoportot is beépítésre került (**10. ábra**). Ez megváltoztatta az abszorpciós spektrumot, batokróm eltolódás következett be, mivel a vinilcsoport hatására kiterjedt konjugáció jött létre és ez újra biztosította, hogy a donor HOMO pályája magasabb energiaszintű legyen, mint az akceptor esetében. A csoport elhelyezkedése nem befolyásolta a feszültségérzékenységet, csak a batokróm eltolódás nagyságát. Ha a donor és a fluorén között helyezkedett el akkor nagyobb konjugáció tudott kialakulni. A fluorén-csoport beépítése a molekulába megtartotta a csökkentett fototoxicitást, és nagyjából háromszoros feszültségérzékenységet eredményezett.⁴²



dsVF2.2(OMe).Cl

63% $\Delta F/F$ per 100 mV

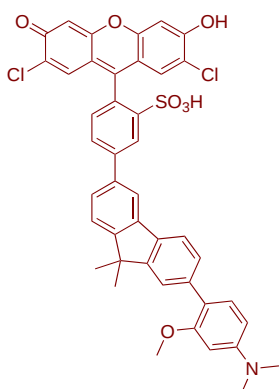
potenciál követése patkány
hippokampális és emberi eredetű
középagyi dopaminerg neuronokban



RVF5

28% $\Delta F/F$ per 100 mV

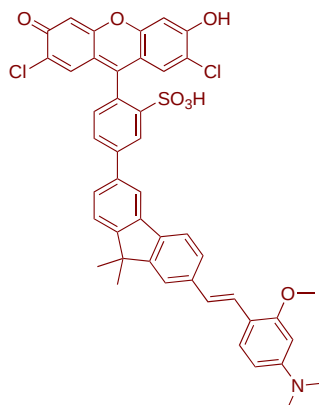
egyfoton mérések
emlős sejteken



fVF

9% $\Delta F/F$ per 100 mV

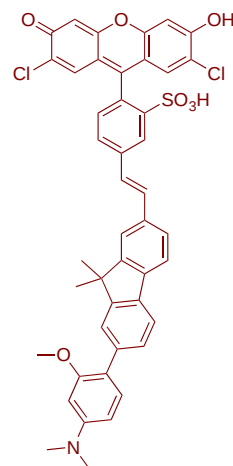
potenciálmérés emlős idegsejteken



2v-fVF

15,2% $\Delta F/F$ per 100 mV

akciós potenciál vizsgálatok szívben
és kardiomiocita egyrétegű sejteken



7v-fVF

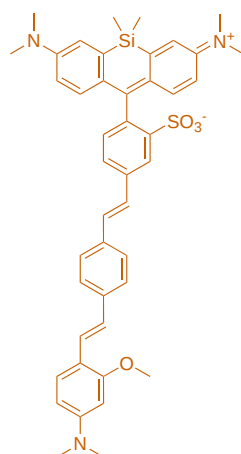
30,6% $\Delta F/F$ per 100 mV

10. ábra: Különböző VF családba tartozó feszültség-szenzorok szerkezete, feszültségérzékenységük és biológiai alkalmazhatóságuk

Az eddigiekben ismertetett VF festékek számos biológiai kísérlet során eredményesen teljesítettek,^{44,23,2} azonban 480-515 nm körül gerjesztődnek és 530 nm körül emittálnak, ezáltal a kék/zöld régiót fedik le. Ugyanígy számos optikai képalkotásban használatos festék is hasonló tartományokat ölel át, például a zöld fluoreszcens protein (GFP), több Ca^{2+} -szenzor, mint a már említett OregonGreen BAPTA (**3. ábra**), valamint optogenetikai eszközök, mint a fény hatására

aktiválható ioncsatorna, a ChannelRhodopsin2 (ChR2).^{45,46} Ebből kifolyólag a feszültség szenzorokat nem lehetséges szimultán alkalmazni az említett optikai eszközökkel. Másrészt figyelembe kell venni, hogy az elkészített festékeket biológiai kísérletek során szeretnék alkalmazni, tehát minimalizálni kell a sejtkárosodást. Ezt alacsonyabb energiájú fotonok segítségével lehet megvalósítani, melyhez 600-900 nm gerjesztési és elnyelési profillal rendelkező szenzorok fejlesztése szükséges. További előnyük, hogy az alacsonyabb energia miatt csökken a fényszórás, valamint kevesebb endogén kromofór abszorbeálja, tehát alacsonyabb autofluoreszencia alakul ki.⁴⁷

Ilyen elnyelési profil céljából fejlesztették ki a Berkeley Red Sensor of Transmembrane potential 1 (BeRST1) elnevezésű festéket, amely szilikorodamin kromofórt tartalmaz **(11. ábra)**.²⁴ A xantén-váz szilícium szubsztitúciójának hatására a molekula abszorpciós és emissziós spektruma eltolódik a közeli infravörös régióba,⁴⁸ valamint növeli a molekula fotostabilitását. A BeRST1 esetében is megfigyelhetjük a szulfonsav-csoportot a szintetikus nehézségek ellenére is. A rodaminvázis vegyületekre jellemző egy spirociklizáció **(1.1. fejezet)**, mely során egy nem fluoreszcens gyűrűs szerkezet jön létre, amely hidrofilebb és képes lesz bizonyos mértékben áthaladni a membránon, ezáltal jelentős háttérfluoreszenciát okoz.²⁴ Azonban a szulfonsav-csoport anionja megakadályozza a spirociklizációt, ezáltal növeli a fluoreszenciát és a membrán külső felszínén lévő visszatartást.^{23,2} A BeRST1 HEK sejtekben való alkalmazáskor a sejtmembránban lokalizálódik, kitűnő fotostabilitást és közepes feszültségérzékenységet mutatott, amely lineárisan változik a fiziológiailag releváns tartományban. Kiemelkedik elődei közül, mivel gerjesztési és elnyelési spektrumának köszönhetően szimultán alkalmazható a fentebb felsorolt optikai eszközökkel.²⁴



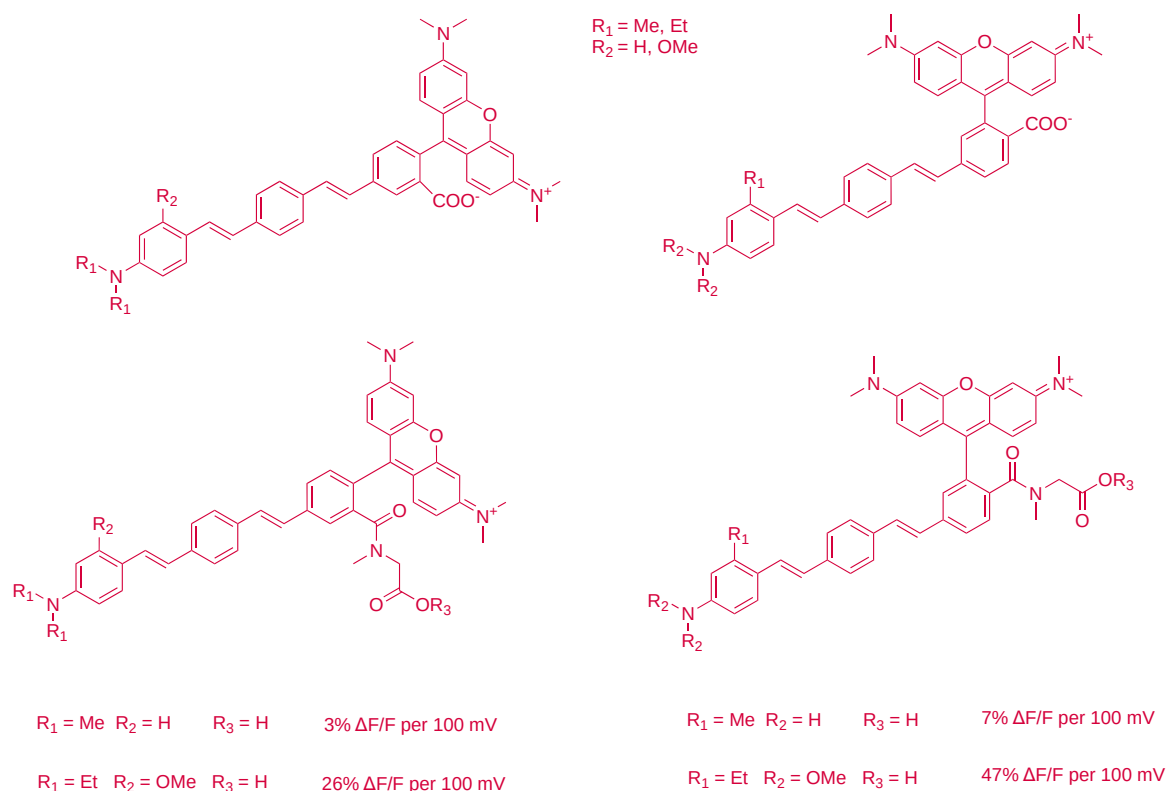
BeRST1

24% $\Delta F/F$ per 100 mV

Chr2 mellett membránpotenciál noninvazív mérése

11. ábra: A közeli infravörös eltolódású BeRST1 molekula felépítése, feszültségérzékenysége és biológiai alkalmazhatósága

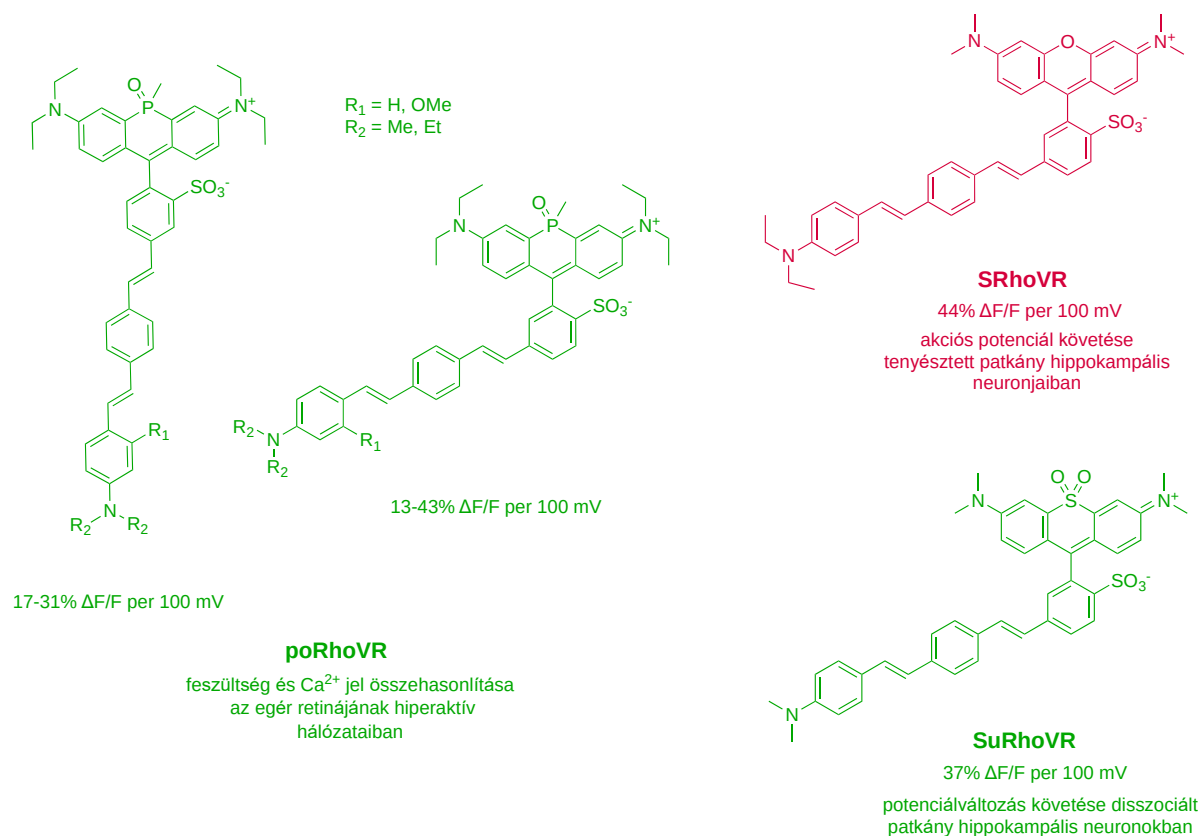
A közeli infravörös eltolódású BeRST1 már használható szimultán bizonyos optikai eszközökkel, azonban a fejlesztés ára a csökkent feszültségérzékenység volt (24 % $\Delta F/F$ per 100 mV).²⁴ Ezenkívül a molekula szintetikus kihívásokat is jelentett, a szilikorodamin és a szulfonsav beépítése révén, így csak alacsony termeléssel lehet előállítani. Ezek továbbfejlesztése érdekében fejlesztették ki a tetrametilrodamin alapú „Rhodamine Voltage Reportert” (RhoVR), melynek elnyelési profilja minden eddigi PeT mechanizmussal működő feszültség-szenzortól különbözik, a sárgától a narancssáráig terjed. A szintetikus munka leegyszerűsítése érdekében leváltották a szulfonsav-csoportot, azonban lényeges volt a membrán lokalizációt biztosítani. Ennek érdekében a laktonizációra hajlamos karboxilcsoportot szarkozinos amidálással rögzítik.³ A molekulák abszorpciós maximuma 565 nm körül mozog, a tercier amidot nem tartalmazó származék esetében bázikus környezetben lejátszódhat a spirociklizáció, mely egy nem fluoreszcens anyagot eredményez. A különbözőképpen szubsztituált származékok (12. ábra) alapján megállapították, hogy a metoxi szubsztituált anilin jobb feszültségérzékenységet mutatott, mint a szubsztituálatlan, valamint, hogy az 5-ös pozícióban szubsztituált rodaminszármazék is magasabb értékeket mutat, mint a 4-es esetében.³ A RhoVR festékek és a GFP-alapú kromofórok együttesen alkalmazhatók kétszínű képalkotáshoz, ezáltal vizsgálható velük egyszerre a Ca^{2+} jel és a membránpotenciál változás.³



12. ábra: A RhoVR feszültség-szenzor festék család tagjai és a különböző származékok feszültségérzékenységének összehasonlítása

A RhoVR festékek továbbfejlesztése több irányban is megtörtént, elsőként a szulfonált rodamin feszültség-szenzorokkal (sRhoVR). Bár a szulfonát-csoportot szándékosan helyettesítették karboxilcsoporttal az alapvegyületek esetében a könnyebb szintetikus út érdekében, azonban több olyan tulajdonságot kölcsönöz a molekulának, ami miatt mégis elkészítették a szulfonált verziót is. Az előállított molekula kiemelkedő jellemzői a nagyon magas feszültségérzékenysége (akár 44 % $\Delta F/F$ /100 mV), legfőképpen pedig, hogy kiválóan alkalmazható mind egyfoton, mind kétfoton mikroszkópos vizsgálatokhoz, amely rendkívül előnyös a festékek alkalmazása során.⁴⁹

Az előzőekben látható kromofórok mindegyikének a gerjesztési és elnyelési spektruma a látható tartományban van, amely így átfedésbe kerül számos endogén kromofórral, mint például a hem.^{50,51} A probléma megoldása végett szükséges egy 650-900 nm tartományban alkalmazható vegyület.^{50,51,52} Ilyen lesz a „phosphine-oxide Rhodamine Voltage Reporter” (poRhoVR), amely foszfor-szubsztituált xantén-vázat tartalmaz (13. ábra). Az abszorpciós és emissziós maximuma 700 nm körül van, feszültségérzékenysége 13-43% $\Delta F/F$ per 100 mV között mozog és jól használható számos optikai Ca^{2+} -szennel, mint például az Oregon Green BAPTA.⁵³



13. ábra: RhoVR származékok szerkezete, feszültségérzékenysége és biológiai alkalmazhatósága

További vöröseltolódású festék a Sulfone Rhodamine Voltage Reporters (SuRhoVR) (13. ábra), melyben a rodaminváz oxigén atomját egy szulfon-csoportra cserélték, ezáltal az abszorpciós és emissziós spektrumot 150 nm-tel tudták eltolni a kapott 710 nm körüli értékre.⁵⁴ Jól ismert, hogy a kisebb energiájú fotonok kevésbé okoznak sejtkárosodást,⁴⁷ mélyebben be tudnak hatolni a szövetbe és ezáltal csökkentik a háttérfluoreszcenciát.⁵⁰ Abban az esetben, ha az oxigént szimplán kén atomra cserélték nagyjából 130 nm-rel kisebb értékeket mértek,⁵⁴ valamint az ilyen fajta molekulákat fényfertőtlenítésre alkalmasak, tehát a sejtek elpusztulását okoznák.⁵⁵ Megfigyelték, hogy a feszültség-szenzor molekulák fluoreszcenciája jelentősen kisebb, mint kiindulási kromofórnak, hiszen a PeT mechanizmusnak köszönhetően kioltódik a fluoreszcencia intenzitás egy része. A távolság növelésével ez a kioltó hatás csökken, ezáltal a meta pozícióban szubsztituált származékok nagyobb feszültségérzékenységet (37% vs 32 %) és jel-zaj viszonyt mutatnak, mint a para helyzetben.⁵⁴

Számos alkalommal említettem a kétfoton mikroszkópiás mérést, mely alkalmazása során kétfoton abszorpció (TPA) történik. A folyamat lényege, hogy a molekula közelítőleg egyszerre képes abszorbeálni két nagyjából azonos energiájú fotont. A végbemenetelének esélye igen

alacsony, valószínűsége nem lineárisan, hanem négyzetesen függ a fény intenzitásától.⁵⁶ Nagy előnye, hogy akár kétszer akkora gerjesztési hullámhosszt lehet alkalmazni, mint egyfoton mérések (amikor egyetlen magasabb energiájú foton abszorpciójának hatására történik a gerjesztés) során, tehát a gerjesztés vörös-infravörös (750 –1350 nm) tartományban történik.⁵⁷ Az alacsony energiájú fotonokkal történő gerjesztés előnyeit már említettem, azonban itt külön ki kell emelni, hogy mivel a kétfoton gerjesztés csak a lézerefény fókuszpontjában történik meg, ezáltal kisebb a fényszórás, nincs fókuszsíkon kívüli jel és mélyszöveti penetrációra alkalmas.⁵⁸ A feszültség-szenzor vegyületek esetében különösen előnyös, hogy bár magasabb hullámhosszokon történik a gerjesztés, mint az egyfoton mérések esetében, azonban az emissziós hullámhossz megegyezik, ezért alkalmazhatóak a jól bevált VF vagy RhoVR típusú festékek esetében is. Emiatt nem szükséges szilícium,²⁴ foszfor⁵³ vagy kéntartalmú⁵⁴ rodaminváz előállítása, melyek nemcsak szintetikus nehézségeket okoznak, hanem a feszültségérzékenységük is jelentősen elmarad az előbbieken említett festékcsaládok tagjaiakétól. Ezenfelül a gerjesztő lézer és a fluoreszcenciás emisszió nagy hullámhosszkülönbségének köszönhetően a detektorral lehetséges csak a fluoreszcens fényt érzékelni, ez csökkenti a háttérsugárzást, ami jobb jel-zaj viszony elérését okozza.⁵⁷

1.3.3. Fehérjealapú feszültség-szenzorok

A kívánt cél eléréséhez az egyik lehetőséget a genetikailag kódolt feszültség indikátorok (GEVI) adják, melyek egy olyan fehérje szekvenciát tartalmaznak, ami képes az adott fehérje fluoreszcenciáját befolyásolni a megváltozó potenciálérték hatására.¹² Legnagyobb előnyük, hogy genetikailag targetálhatók, ezáltal megvalósítható egy vizsgálni kívánt sejttypus szelektív festése, így csökkentve a háttérfluoreszcenciát és javítva a jel-zaj viszonyt.²³

Az első ilyen feszültség-szenzort 1997-ben állították elő, mely egy zöld fluoreszcens fehérje (GFP) és egy kálium ioncsatorna molekuláris fúziójából jött létre és a Flash elnevezést kapta. Működésének elve, hogy az ioncsatorna átrendeződik a feszültségváltozás hatására és ez befolyásolja a GFP fluoreszcenciáját.⁵⁹ Az első előállított fehérjealapú szenzorok nem hoztak nagy áttörést, mivel feszültségérzékenységük nagyon alacsony volt, valamint a membránban sem tudtak megfelelően lokalizálódni.⁶⁰

Az évek során rengeteg új irányvonalat fedeztek fel, ennek köszönhetően három elkülöníthető csoport alakult ki a fehérjealapú feszültség-szenzorok világában: elektrokróm elven működők (Arch,⁶¹ QuasAr,⁶² Archer,⁶³ Archon⁶⁴), Förster rezonancia energiaátviteli

párokon (FRET) alapuló (QuasAr2-FP,⁶⁵ MacQ-mCitrine, Ace-mNeon,⁶⁶ VARNAM⁶⁷ stb.), valamint VSD alapú szenzorok (ASAP,¹² JEDI,⁶⁸ ArcLight⁶⁹ stb.).

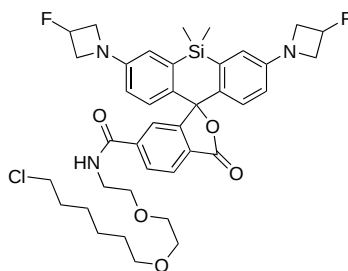
A kutatásom alapját azonban a fehérjealapú szenzorok számos hátránya és limitációja adja. Kezdetben a festékek feszültségérzékenysége igen alacsony ($0,5-10\% \Delta F/F / 100 \text{ mV}$) volt, ezáltal a kapott jelek nem igazán tudtak kiemelkedni a zajból, nehezen detektálhatók voltak.^{61,70} További detektálási nehézséget okoz, hogy a FRET alapú szenzorok nem alkalmasak kétfoton mikroszkópiás mérésekhez,⁶⁷ ami limitálja az alkalmazhatóságukat. Bár ezt más elven működő festékek használata kiküszöbölheti, azonban az elektrokróm elven működők esetében pedig a gerjesztés egy ionfluxust eredményezhet,⁶³ amely befolyásolhatja a neuronok normál működését, így hamis eredményeket nyerhetünk. Ezenkívül a mikroszkópiás képalkotások során a fluoreszcenciájuk függ a besugárzás erősségétől és hullámhosszától.⁷¹ Alkalmazásuk rendkívül időigényes, mivel a szenzor fehérjék kifejeződése több napot vagy hetet vesz igénybe, valamint a működésük sebessége is elmarad a kémiai festékektől.¹²

1.4. Hibrid feszültség-szenzorok

Az évek során jelentős fejlődéseket értek el a GEVI-k fejlesztése során, azonban továbbra is előrelépés lenne szükséges fényességben, a plazmamembránban történő lokalizációban és a kétfoton teljesítményben. Ezekben a felsorolt tulajdonságokban a kémiai kismolekulás festékek sokkal jobban teljesítenek, azonban nem kódoltak genetikailag. Az előnyös tulajdonságok együttes használata érdekében kombinálták a kétfajta szenzor csoportot és ebből születtek meg a hibrid indikátorok. A genetikai targetáláshoz nagyon gyakran használnak úgynevezett HaloTag-et, amely egy önjelölő fehérje, egy haloalkán dehalogenáz módosított formája. Alkalmazása során biológiai módszerekkel a vizsgálni kívánt sejtek által kifejeztetik a HaloTag enzimet, míg a szintetizált molekulánkat, a HaloTag ligandumot olyan csoporttal látjuk el, hogy az enzim szelektív irreverzibilis módon magához kapcsolja.²⁶ A kismolekulás vegyületek ismertetésével analóg módon a hibrid festékeknek is három nagy csoportját különböztetjük meg. Beszélhetünk VSD, FRET alapú és PeT mechanizmusú hibrid szenzorokról.

A VSD hibrid szenzorok felépítése egy cirkulárisan permutált GFP-t és egy HaloTag-liganddal szubsztituált rodaminvázas fluorofórt tartalmaz. Működésének alapja, hogy a szenzorban lévő fehérjeszerkezet megváltozása eltolja a rodaminvázas festék spirociklizációja egyensúlyát (**1.1. fejezet**), megváltoztatva ezzel a fluoreszcenciáját. Két meghatározó tagja a HASAP és a HArclight, melyek az ASAP,¹² valamint az ArcLight⁶⁹ elnevezésű fehérjealapú

feszültségsszenzorok analógjai. Az irodalomban leírt eljárás esetén a kismolekulás festéket a Janelia Fluor család egyik tagja adja (**14. ábra**).⁷²



JF₆₃₅-HaloTag

14. ábra: A Janelia Fluor 635 spirolakton formája HaloTag liganddal ellátva, amelyet az irodalomban leírt eljárásban a HASAP és a HARclight hibrid feszültségsszenzorok kismolekulás festék komponenseként alkalmaznak

A FRET típusú szenzorok családjába tartozik a VOLTRON.⁷³ Felépítését tekintve egy fehérjealapú feszültségsszenzor mikrobiális rodopszin domént^{74,75,76} kombinál egy fluorofór festékkel^{77,78} egy HaloTag domén segítségével. Feszültségérzékelési mechanizmusa, hogy potenciálváltozás hatására eltolódás figyelhető meg a rodopszin domén abszorpciós spektrumába,^{74,61} ennek mértéke befolyásolja a fluoreszcencia kioltásának mértékét a FRET (**5. ábra**) mechanizmuson keresztül. A kapott feszültségsszenzor akár -23% $\Delta F/F$ /100 mV értékkel működött a tesztelés során.⁷³

A másik elterjedt FRET alapú hibrid szenzor a „hybrid voltage indicator” (HVI).⁷⁹ Abszorpciós spektrumuk maximuma a távoli vörös régióban található, amely különösen előnyös vastagabb sejteknél és hosszabb méréseknél. Felépítésüket tekintve egy transz-ciklootén részt tartalmaz, melyet enzim segítségével helyspecifikusan konjugáltak egy enzim mutánshoz,⁷³ mely képes egy bioortogonális Diels-Alder cikloaddícióval kötést kialakítani egy tetrazin-konjugált szerves fluorofórral. Az így kapott hibrid feszültségsszenzor működési elve az elektrokróm effektuson alapszik. A molekula fluoreszcencia intenzitása ebben az esetben függ a membránban kialakuló elektromos tér nagyságától és irányától is. A legnagyobb érzékenységgel rendelkező festék -39% $\Delta F/F$ /100 mV feszültségérzékenységet mutatott, valamint sebességük is megfelel a követelményeknek.⁷⁹

A kutatásomhoz legszorosabban kapcsolódó hibrid szenzorok a PeT mechanizmus elvén működők. Ekkor egy PeT alapon működő kismolekulás feszültségsszenzort szubsztituálunk egy

kapcsoló ágenssel, amely képes kötést létrehozni a megfesteni kívánt sejtek által kifejezett enzimmel.⁸⁰

Ahhoz, hogy a kismolekulás feszültség szenzorok kötődni tudjanak a vizsgálni kívánt sejtek felszínén lévő receptorokhoz, szükséges egy kapcsolási mód kialakítása. Erre ad lehetőséget például a SpyTag, SpyCatcher páros. Az alkalmazni kívánt VF festéket egy polietilén glikol (PEG) linkerrel szubsztituálták, majd azon keresztül kapcsolták a SpyTag peptidhez, mely egy izopeptid kötés kialakítása révén tud majd kapcsolódni a SpyCatcher-hez. Ezáltal specifikusan azokat a sejteket lehet megfesteni, melyek kifejezik a SpyCatcher enzimet. Az így kialakított feszültség szenzorokat VoltageSpy-nak nevezték el és nagy érzékenységgel és gyorsasággal működnek.⁸⁰ A genetikai targetálhatóság lehetőséget ad arra, hogy akciós potenciált mérjenek a sejtesttől akár több száz mikrométerre.⁷⁹

A VoltageSpy felépítésének analógiájára a RhoVR festékcsaládot egy klóralkán HaloTag ligandhoz kötötték, szintén egy hosszú PEG linkerrel keresztül., ezáltal alkalmazásukkor csak azokat a sejteket festik meg, melyek kifejezik a HaloTag enzimet. A festék számos optikai szenzorral szimultán is alkalmazható, mint például a GCaMP Ca^{2+} -szenzorral. Megfigyelték, hogy a molekula feszültségérzékenysége jelentősen függ három faktortól. Először is az anilin szubsztitúciójától, mely már a RhoVR festékekre is igaz volt, valamint a sejtek által kibocsátott enzim mennyiségétől. Végül pedig a kapcsoló PEG linker hosszától. Rövid linkerrel egyáltalán nem is volt feszültségérzékeny a molekula, feltehetően a klóralkán láncvéghöz kapcsolódó HaloTag közelségében a szterikus gátoltság révén már nem tudott lokalizálódni a plazmamembránba. A 25 ismétlődő egységet tartalmazó szenzor már eléri az eredeti RhoVR molekulák érzékenységet.²⁶

1.5. Feszültség szenzorok tesztelése

A feszültség szenzor molekulák fejlesztése során elengedhetetlen feladat azok tesztelése, melyet leggyakrabban biológiai laboratóriumokban végeznek. A legelterjedten alkalmazott módszer a mikroszkópiás képalkotás állati sejt minták segítségével, mely egy jól bevált megbízhatóan alkalmazható, reprodukálható mérés, azonban ez számos nehézséggel és limitációval jár. Jellemzően konfokális, egyfoton vagy kétfoton mikroszkópokat alkalmaznak, ezáltal jelentősen műszerigényes. A festékeket emlős, legtöbbször egér agyszeletén vagy egyéb állati eredetű mintákon vizsgálják, ami állatetikai kérdéseket vet fel. Az állatok tenyésztése, fenntartása és előkészítése, valamint a mérések elvégzése, értékelése pedig igen időigényes.

Az állati minták használatának mellőzésére ad lehetőséget a HEK293 sejtvonal, amely egy szövettényészetben növesztett humán embrionális vesesejt. Ebben az esetben is mikroszkópiás képalkotást végeznek, azonban itt imitálni kell a membránpotenciált, tehát feszültséget kell létrehozni az alkalmazott sejtek membránjában. Ehhez az úgynevezett „patch-clamp” módszert alkalmazzák, mely során egy elektródot tartalmazó üvegpipetta segítségével átszakítják a sejtmembránt. A sejtközi térben található egy referencia elektród, amit felhasználva áram segítségével feszültséget hoznak létre a membránban. Ezalatt mikroszkóp használatával nyomon követik a feszültség-szenzor fluoreszcencia intenzitásának változását a potenciálváltozás hatására.

A fehérjealapú szenzorok fejlesztése során alkalmazott irányított molekuláris evolúció óriási mennyiségű mutáns gén vizsgálatát igényli eltérő körülmények között. Ennek érdekében létrehoztak egy robotizált mikroszkópiás tesztelést HEK sejteken.⁶⁴ A robotizáció jelentősen gyorsítja a szenzorok fejlesztésének menetét, valamint képes arra, hogy a minták egyfoton vizsgálatát követően kiválassza a legjobb tulajdonságúakat és már csak ezeken végezzen kétfoton mérést.⁶⁸

A tesztelések megkönnyítése érdekében már biológiai mintát nem igénylő módszerek fejlesztéséről is olvashatunk az irodalomban, például nano-fekete lipid membránok segítségével. Ekkor fekete lipid membránokkal (BLM) hoznak létre szabadon álló lipid kettősréteget és kombinálva az elektromos mérést és a fluoreszcencia mikroszkóp alkalmazását vizsgálják a membránpotenciál változásának hatását a fluoreszcencia intenzitásra. A módszer előnyei, hogy szabadon megválaszthatjuk a lipidet és a használt feszültségértékeket, nagy stabilitásúak, valamint hosszú mérések alkalmával is használhatók.⁸¹

Ezenkívül a kismolekulás szenzorok fejlesztésének egyszerűsítése érdekében szerették volna csökkenteni a biológiai laboratóriumok alkalmazási igényét. Emiatt a tesztelés fluorimetriás készülékekre való kiterjesztését vizsgálták a di-4ANNEPS feszültség-szenzor segítségével lipid vezikulákon.⁸²

A membránpotenciál imitálása érdekében létrehoztak egy olyan biológiai rendszert, melyben a liposzómákon belül, valamint kívül található K^+ -oldat koncentrációja különbözik. Az ozmózisnyomás kiküszöbölésére a kisebb K^+ koncentrációjú oldathoz szukrózt is adtak.⁸² Mikor a rendszerhez fázistranszfer katalizátort adnak, mely szelektíven a K^+ -t transzportálja, az eltérő ionkoncentráció hatására megindul egy iongradiens. A membrán közvetlen közelében

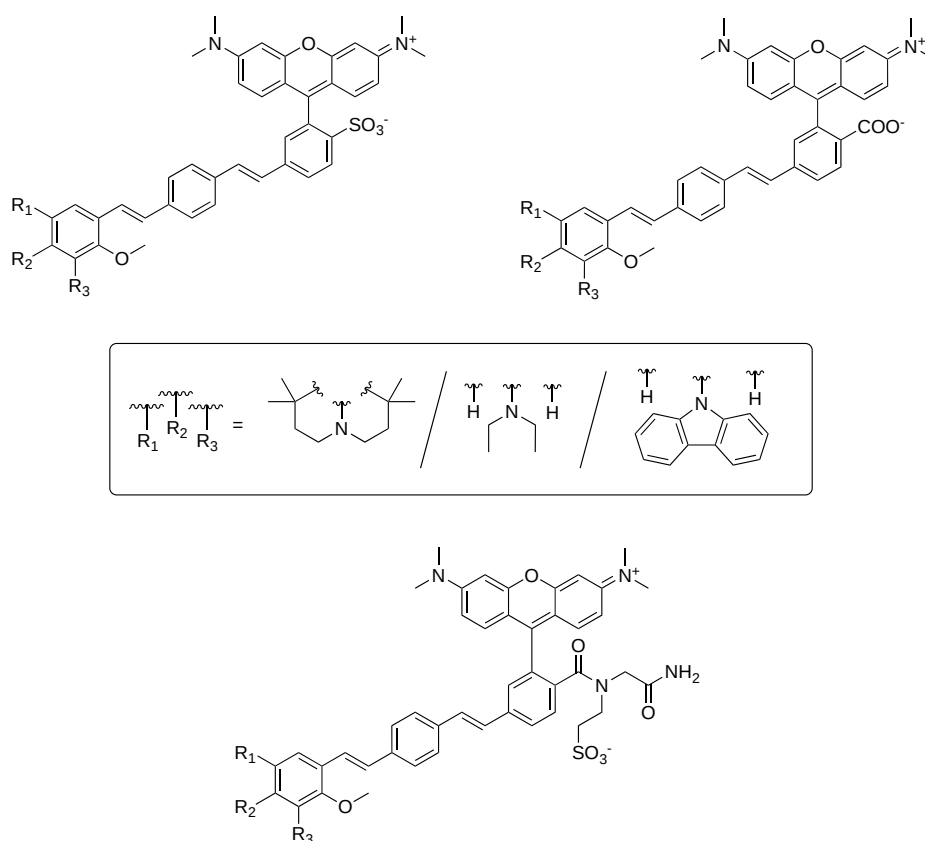
azonban felgyűlnek az ott ragadt anionok, melyek egy negatív töltést hoznak létre. Emiatt a membrán másik oldalán sem tud egy homogén koncentráció kialakulni, hanem a membrán mellett pozitív töltés alakul ki. A két töltés hatásaként létrejön egy elektromos potenciál. Ennek hatását a feszültség-szenzor molekula fluoreszcencia intenzitásában fluoriméter segítségével mérték. Megfigyelték, hogy az alkalmazott valinomycin ionofór esetében az intenzitás akkor is növekedett, mikor nem volt koncentrációkülönbség, tehát potenciál. Ebből arra következtettek, hogy a valinomycin is kismértékű kölcsönhatásba lép a festékkel.⁸² Bár ez a tesztelési módszer ígéretes lehetőségeket rejt, azonban még igen feltérképezetlen.

1.6. A szenzorok optimalizálása kvantumkémiai számítások segítségével

Mint azt már az előzőkben említettem, a feszültségérzékenység a PeT mechanizmussal működő festékek esetében nagyban függ a mechanizmus hajtóerejétől. Mivel ezt alapvetően meghatározza a molekulapályák energiája, ezáltal a pályaenergiák modellezésével megjósolható a mechanizmus megjelenése, feltérképezhető, hogy mely molekulák lesznek alkalmasak feszültségérzékeny festékeknek. Ezen alapulva Evan W. Miller és kutatócsoportja vizsgálták a különböző festékek HOMO és LUMO relatív pályaenergiáinak a különbségét egy fordított PeT mechanizmussal működő szenzor család létrehozása érdekében. Megcserélték a donor és akceptor közötti elektrontranszfer irányát, ezáltal pedig a molekula be-ki kapcsolásának pozícióját is. Az eddigiekben látott molekulák esetében az anilin donor adott át egy elektront a gerjesztett fluorofórnak és depolarizáció esetében a mechanizmus gátlásakor kezdett fluoreszkálni a molekula, míg ebben az esetben pont fordítva a gerjesztett fluorofór ad át egy elektront az elektronban szegény végcsoportnak és a hiperpolarizáció gátolja a PeT mechanizmus működését externális membránlokalizáció esetében. A kísérlet során sűrűség funkcionális elmélet (DFT) számításokat végeztek. A számítások által prediktált értékek alapján sikeresen szintetizáltak két új feszültség-szenzor festéket.⁸³ A molekula modellezése, a pályaenergiák számítása, az abszorpciós és emissziós spektrum jóslása egy ígéretes lehetőség a feszültségérzékenység optimalizálására, azonban az irodalomban még kevés példát olvashatunk róla.

2. Célkitűzések

A kutatócsoportom munkájának célja különböző biológiai kutatásban felhasználható fluoreszcens festékek és molekuláris szenzorok fejlesztése. Ezen belül az én témám a feszültség-szenzor molekulák, melyek mechanizmusának feltérképezését és fotokémiai tulajdonságainak továbbfejlesztését tűztem ki célul. A munkám során szerettem volna előállítani két irodalomban már ismert festéket a tesztelések és a szintézisek megismerése céljából. Ezenfelül célom volt olyan feszültség-szenzor előállítása, amely esetében nem következik be spirociklizáció, és ezen belül vizsgálni a donor anilin nitrogénjének rotációképességének hatását a molekula feszültségérzékelésére. Ezek elérése érdekében célom volt szintetizálni hét új, irodalomban még nem ismert festéket (**15. ábra**).



15. ábra: A szintetikusan előállítani és spektroszkópiailag karakterizálni kívánt molekulák szerkezete

A molekulák nagyobb áteresztőképességű tesztelhetősége érdekében szükséges lenne egy robosztus módszer kialakítása, mely során nagy idő-, munka-, és költségigényű fluoreszcens mikroszkópiás mérések nélkül lehet vizsgálni az elkészített molekulák fluoreszcencia

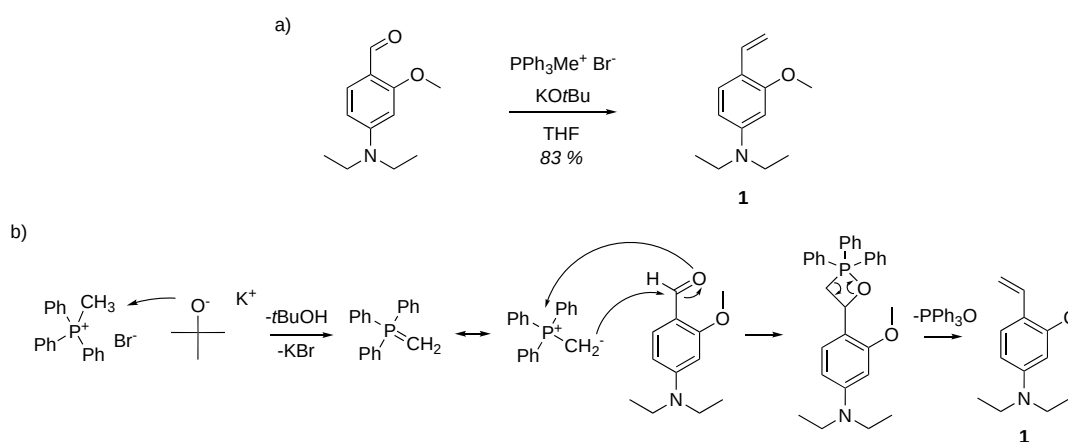
tulajdonságait. Célom egy ilyen liposzomális rendszeren alapuló fluorimetriás módszer vizsgálata, az elkészített molekuláim tesztelése.

Annak érdekében, hogy a szintetikus erőforrások hatékonyságát maximalizálni lehessen, szeretném vizsgálni a különböző szerkezetek fluoreszcenciáját kvantumkémiai számítások segítségével, és ezáltal megalapozni a lehetőséget, hogy a jövőben számítások segítségével lehessen prediktálni a festékek feszültségérzékelési tulajdonságait.

3. Kísérleti eredmények és diszkusszió

3.1. Irodalmi reprodukció

A kutatási munkámat egy irodalomban már leírt feszültségszenzor molekula szintézisével kezdtem, hogy elősegítse a téma megértését, működésének tesztelését, valamint a szintetikus munka lépéseinek megismerését. A fentebb már ismertetett legjobb tulajdonságú RhoVR molekulát állítottam elő,³ mivel ennek analógiájára szerettem volna új festékeket fejleszteni. A molekula szintézise során külön szintetizálják a donor és az összekötő részt, amelyet együttesen horgonyrésznek nevezünk, valamint a rodaminvázis festékrészt.

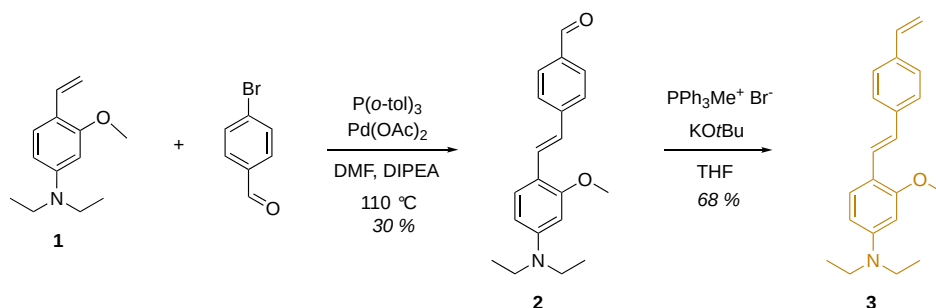


16. ábra: a) Dietil-aminnal szubsztituált horgonyrészsztézisének első lépése; b) az elvégzett Wittig-reakció mechanizmusa

Elsőként a horgonyrész előállításához vettem a kereskedelmi forgalomban kapható 4-dietilamino-2-metoxibenzaldehidet és egy Wittig reakció segítségével alakítottam át az oxocsoportot vinilcsoporttá (**16. ábra**). Az ilyen típusú reakciók során először a támadó ágenszt kell kialakítani a reaktánsokból, ebben az esetben a PPh_3MeBr metilcsoportját a KOtBu deprotonálja. Az így keletkezett anion a kiindulási anyag karbonil-szénatomjára intéz nukleofil támadást (**16. ábra**). Több tisztítási módszer tesztelése után a nyerstermék ciklohexános triturációja bizonyult megfelelőnek, mivel a kívánt termék jól oldódik benne, viszont a trifenilfoszfinoxid nem.

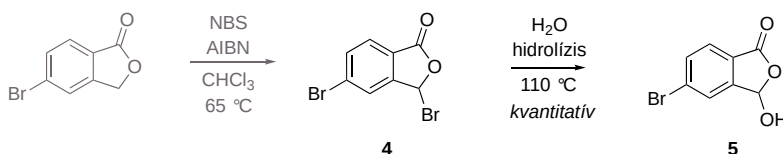
A szintézis következő lépése egy Heck-reakció, mely során beépítem a következő fenilén-csoportot a molekulába (**17. ábra**). A Heck-reakcióhoz elengedhetetlen katalizátorként $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ -t, míg ligandként $\text{P}(\text{o-tol})_3$ -t alkalmaztam. A kiindulási anyagokhoz elsőként a ligandot adtam hozzá, majd a bázist, az oldószert és csak legutolsóként a palládium katalizátort.

A reakcióelegyet flash kromatográfiával megtisztítva kaptam **2**-t. A horgonyrész kialakításának utolsó lépése egy újabb Wittig-reakció (**17. ábra**), amelyet a fentebb leírtak analógiájára végeztem. A terméket további tisztaság elérése érdekében flash kromatográfiával is tisztítottam.



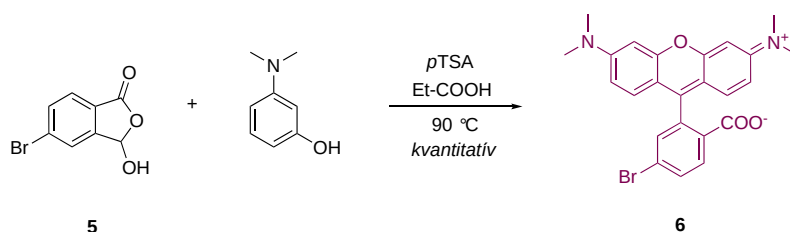
17. ábra: A RhoVR horgonyrész szintézisének két utolsó lépése, mely során egy Heck- és egy Wittig-reakció megy végbe

A festékrész előállításának első lépését, a brómfталid gyökös, benzil-helyzetű brómozását a kutatócsoportom egy másik tagja végezte, melyből én egy hidrolízissel állítottam elő **5**-ös számú vegyületet (**18. ábra**).



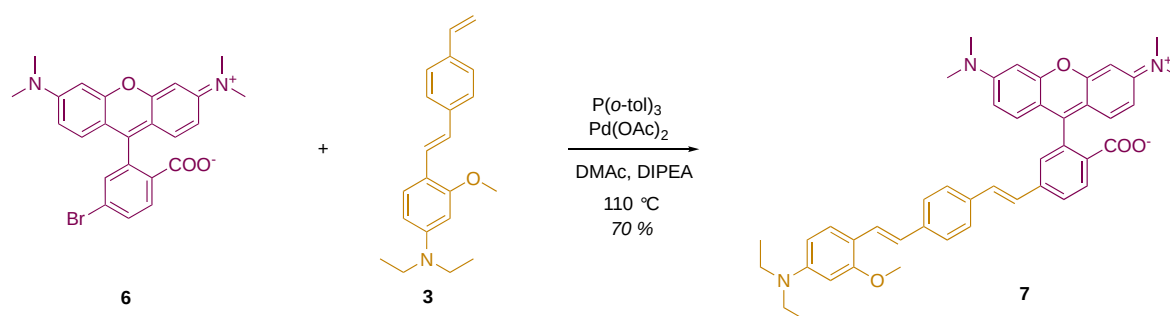
18. ábra: A rodamin származék előállításához szükséges kiindulási anyag szintézise vízzel való forralás segítségével

A festék részt **5** és 4-dimetilaminofenol oxidatív kondenzációjával állítottam elő (**19. ábra**). Az eddig felsorolt reakciók mindegyikét inert atmoszférában végeztem, míg ennél a reakciónál kulcsfontosságú a levegő jelenléte az oxigén miatt. A reakciót propionsavban, *p*-toluolszulfonsav katalizátor segítségével végeztem, majd a terméket kromatográfiásan megtisztítva kaptam a **6**-os számú vegyületet.



19. ábra: A karbonsavas festék rész előállítása az **5**-ös számú vegyület és 3-dimetilaminofenol oxidatív kondenzációja segítségével

A végtermék előállítása a két létrehozott intermedier Heck-reakciójával történt (**20. ábra**). A reakció elindítása után 19 órával a HPLC-MS mérése alapján a konverzió nem volt teljes, maradt még **3** a reakcióelegyben. A reakciópartner, **6** egy része a palládium-katalizátor miatt debrómozódik, ezért nagyobb feleslegben kell alkalmazni. A nyerstermék tisztítását kétféleképpen is elvégeztem, a szennyezők elválása és a termelés alapján a flash kromatográfiás tisztítás (70 %) sikeresebb volt, mint a preparatív HPLC (54 %) esetében.

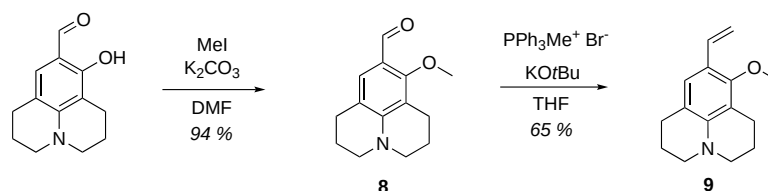


20. ábra: A RhoVR (**7**) szintézisének utolsó lépése, mely során az előállított festék- (**6**), valamint horgonyrészt (**3**) egy Heck-reakcióval kapcsoljuk össze

3.2. Eltérően szubsztituált donort tartalmazó feszültség szenzor festékek horgonyrészének szintézise

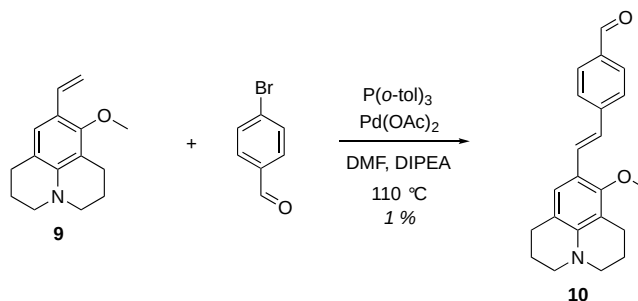
A kutatásom során szerettem volna vizsgálni, hogy a donor anilin nitrogénjének szubsztitúciója hogyan befolyásolja a molekula feszültségérzékeny tulajdonságait. A hipotézis szerint a nitrogén csökkentett rotációkészsége növeli a PeT mechanizmus lejátszódását, ezáltal növeli az érzékenységet. Az elmélet tesztelésére kétfajta szerkezetet szerettem volna létrehozni. Az anilin szubsztitúciójánál figyelembe kellett vennem, hogy az irodalomban már megfigyeltek alapján a molekula feszültségérzékenysége az anilinen lévő elektronküldő csoportok hatására nő. Ezáltal olyan szubsztituens lesz vélhetően alkalmas, mely gátolja a rotációt, de elektronban dúsítja az aromás rendszert. Elsőként egy julolidines származékot, amely esetében a nitrogén gyűrűként hozzá van rögzítve a sztirol-csoporthoz.

A horgonyrész szintéziséhez szükséges **8** nem volt elérhető számomra, ezért egy metilezés segítségével állítottam elő 8-hidroxijulolidin-9-karboxaldehidből (**21. ábra**). Ezután a fentebb leírtak analógiájára végeztem a lépéseket.



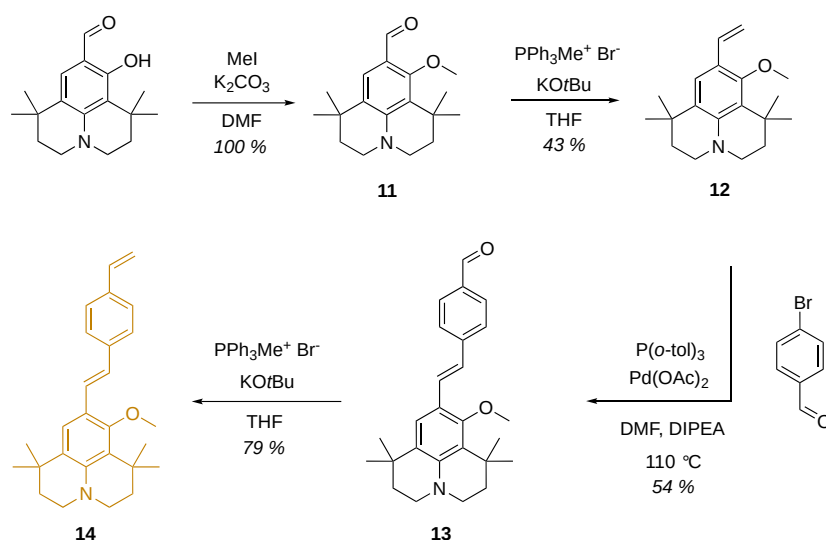
21. ábra: A julolidines horgonyrész előállításának kezdő lépései, mely során egy metilezés, valamint egy Wittig-reakció játszódik le

A **9**-es számú vegyület nem volt stabil, 0-5 °C-on egy hét alatt jelentős részben egy ismeretlen anyaggá alakult. A következő lépést még elvégeztem (**22. ábra**), azonban a reakció során a termék **10**-et mindössze 1%-os termeléssel sikerült kinyerni, ami szintén mutatta, hogy a kiindulási anyag már nem volt megfelelő.



22. ábra: A stabilitási problémák miatt részben átalakult kiindulási anyaggal (**9**) elvégzett Heck-reakció körülményei

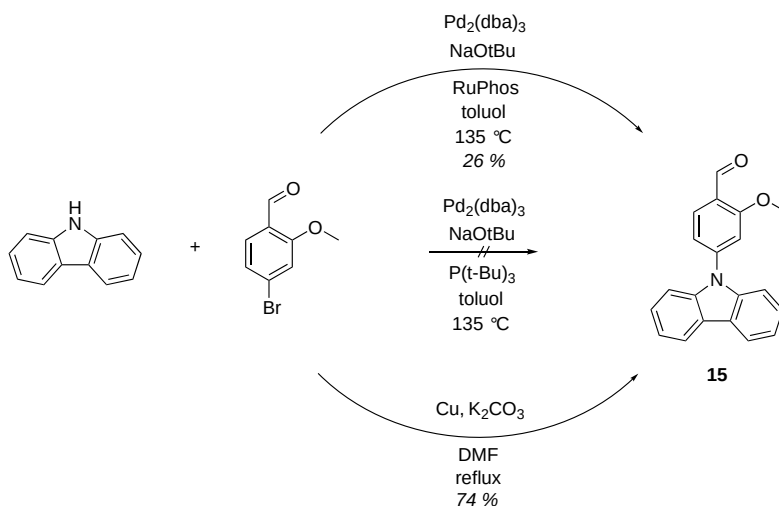
A tapasztalt problémák miatt egy stabilisabb származékot szerettem volna előállítani, amely szintén tartalmazza a julolidines részt. Az előzőekben előállított metoxijulolidin származék (**9**) hajlamos kinolíniummá oxidálódni, amely indokolhatja a stabilitási problémákat. Ennek elkerülése érdekében egy tetrametil-julolidin származék előállítását tűztem ki célul az eddig elvégzett reakciók analógiájára (**23. ábra**), mely esetében az átalakulás nem következhet be.



23. ábra: A tetrametiljulolidines horgonyrész szintézise, mely során egy kereskedelmi forgalomban kapható aldehidből négylépésen keresztül jutunk el a céltermékig

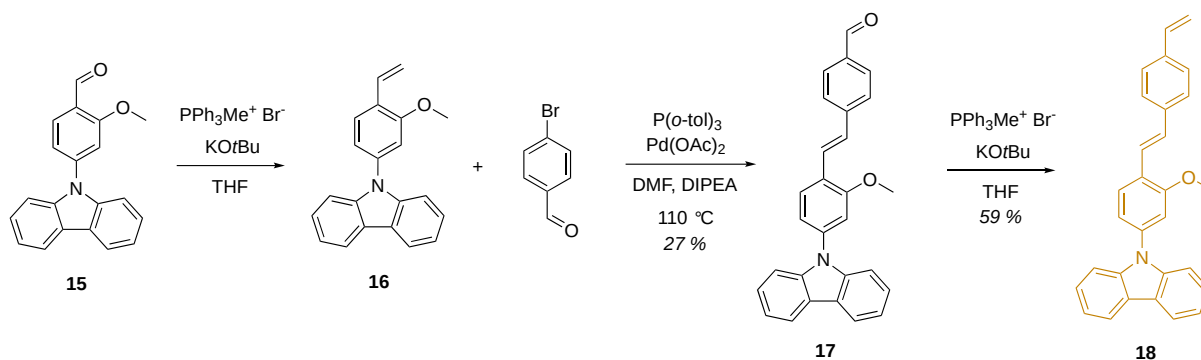
A **14**-es esetében a nitrogén teljesen merev helyzetben van, gátolt a rotációja a benzol gyűrűvel való kötése mentén. A köztes állapot eléréséhez, mely molekula esetében a nitrogén rotációja kissé megengedett, egy olyan csoporttal kell szubsztituálni, amely szterikusan nagy és gátolja a teljes forgást, azonban nincs kötésben a benzol gyűrűvel. Mivel a karbazol egységet széles körben alkalmazzák PeT donorként szenzorokban^{84,85} és fotovoltatikus rendszerekben,⁸⁶ ezért ennek használata tűnt a legmegfelelőbb választásnak.

A Wittig-reakció kiindulási anyagának előállításához egy nitrogén–szén-kötés kialakítására van szükség, melyet először Buchwald-Hartwig reakció segítségével állítottam elő. A $\text{P}(\text{tBu})_3$ katalizátor alkalmazásakor a redukáló hatásának köszönhetően az alkohol származékot kaptam, míg 16% RuPhos és 8% $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ jelenlétében mikrohullámú reaktorban sikeresen előállítottam a megfelelő terméket. A reakció optimalizálása érdekében **15** előállítását megvalósítottam Ullmann-reakció segítségével is, amely 48%-os termelésnövekedést eredményezett (**24. ábra**).



24. ábra: A karbazol és a 4-bróm-2-metoxibenzaldehid reakciója Buchwald-Hartwig körülmények között, valamint Ullmann-reakció esetében

A második lépésben alkalmazott Wittig-reakció (**25. ábra**) első két próbája során feltűnően kisebb termelésekkel kaptam **16**-ot, mint az előzőekben elvégzett ilyen típusú kísérleteknél. Ez jelentősen lerontotta a karbazolos horgonyrész előállításának össztermelését. Az első alkalommal 34%, míg másodikra csak 29% termeléssel sikerült előállítani a terméket, miközben az eddig elvégzett Wittig-reakciók tapasztalata alapján 50-80% volt ez a jellemző érték. Mivel a reakció lejátszódását követően a HPLC-MS teszt alapján nem bomlott el a termék és nem keletkeztek jelentősebb melléktermékek sem, ezért a feldolgozás során lehetett a probléma. Ezalapján arra következtettem, hogy a molekula esetlegesen elbomlik a flash kromatográfiás tisztítás során a szilika géllel töltött oszlopon. Mivel a reakció során keletkező melléktermék, a trifenilfoszfinoxid nem zavarja a következő lépést, valamint a célmolekula elérése előtt még újabb kromatográfiás tisztításra is sor fog kerülni, emiatt a reakcióelegyet az oldószer eltávolítása után feldolgozás nélkül használtam fel a kapcsolási reakcióban. A két reakció együttes termelését tekintve a tisztítási lépés kihagyásával 20%-ról 27%-ra sikerült növelni, amely alátámasztja a molekula inkompatibilitását a feldolgozás valamely elemével. Utolsóként a szokásosan alkalmazott Wittig-reakcióval kaptam **18**-at, a második nitrogénen eltérően szubsztituált feszültségszenzor intermediert (**25. ábra**).

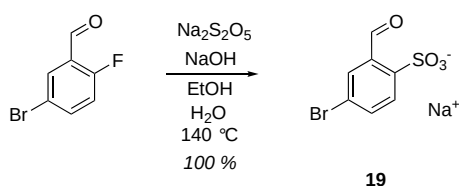


25. ábra: A karbazolos horgonyrész szintézisének lépései, mely során felváltva két Wittig- és egy Heck-reakció megy végbe

3.3. A feszültségsszenzor fluorofór részének szintézise

Mint azt már az irodalmazás résznél olvashattuk, a rodamin-származékok magas kvantumhozamaiknak és kiemelkedő fotostabilitásuknak köszönhetően tökéletesen alkalmasak feszültségsszenzor festékek fluorofór pozíciójába. Az irodalmi reprodukció során már előállítottam egy festékrészt, **6**-ot, azonban a rodaminok spirociklizációja csökkenti a fluoreszcencia intenzitását, valamint a nagyobb mértékű membránpermibilitásuk csökkenti a feszültségjel nagyságát. Ennek elkerülése érdekében elsőként a festékrészt karboxilcsoport helyett szulfonsav-csoporttal láttam el, mivel így nem lép fel spirociklizáció, valamint a csoport javítja a membránlokalizációt is. Ez számos szintetikus nehézséget felvetett.

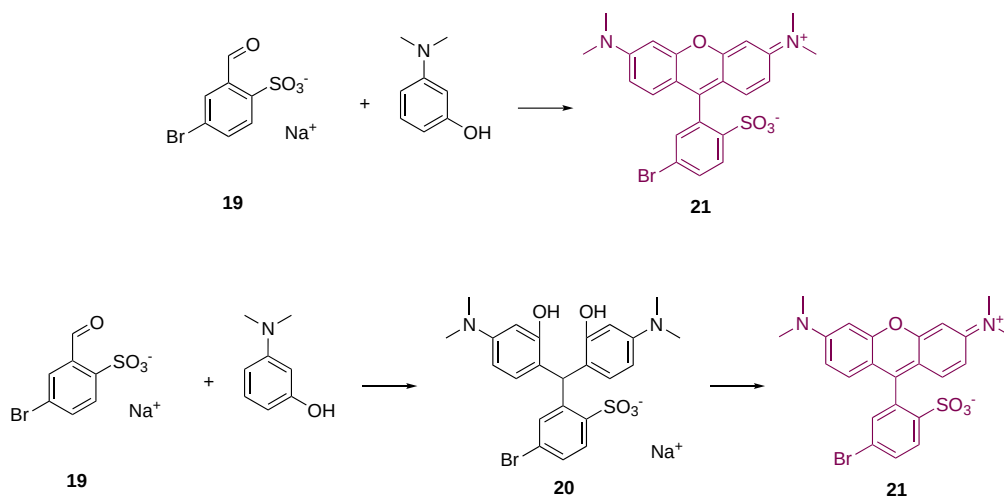
Először a **6**-os vegyület analógiájára szerettem volna előállítani a molekulát, ehhez szükséges **19**-et 5-brom-2-fluorbenzaldehydből állítottam elő mikrohullámú reaktor segítségével (**26. ábra**).



26. ábra: A szulfonsavas festékrész kiindulási anyagának szintézise mikrohullámú reaktorban történő forralás segítségével

Az ezt követő oxidatív addíciót egy-, illetve kétlépéses úton is elvégeztem (**27. ábra**). **21** előállítása számos szintetikus kihívással járt, mivel az irodalomban leírtakkal ellentétben minden alkalommal csak alacsony termeléssel sikerült előállítani, valamint több esetben nem is a várt termék keletkezett. Az elvégzett két reakció alapján elmondható, hogy a propionsavas

módszer nem megfelelő a **21**-es vegyület előállításához. Az alkalmazott módszerek (**1. táblázat**) esetében a nyers termék megtisztítása idő- és munkaigényes a savas reakcióelegy semlegesítése, valamint kromatográfiás tisztítása miatt. A vizsgált reakcióutak közül kénsav 60%-os vizes oldata a legalkalmasabb a reakció elvégzéséhez, amely segítségével közepes termeléssel kellő mennyiségben sikerült előállítani a **21**-es számú vegyületet.



27. ábra: A szulfonsavas festékrész előállításához alkalmazott egy-, illetve kétlépéses reakcióút a **19**-es számú vegyület és 3-dimetilaminofenol segítségével

1. táblázat: **21** előállítására tett kísérletek körülményei és izolált termelései; ^a: kétlépéses szintézisút

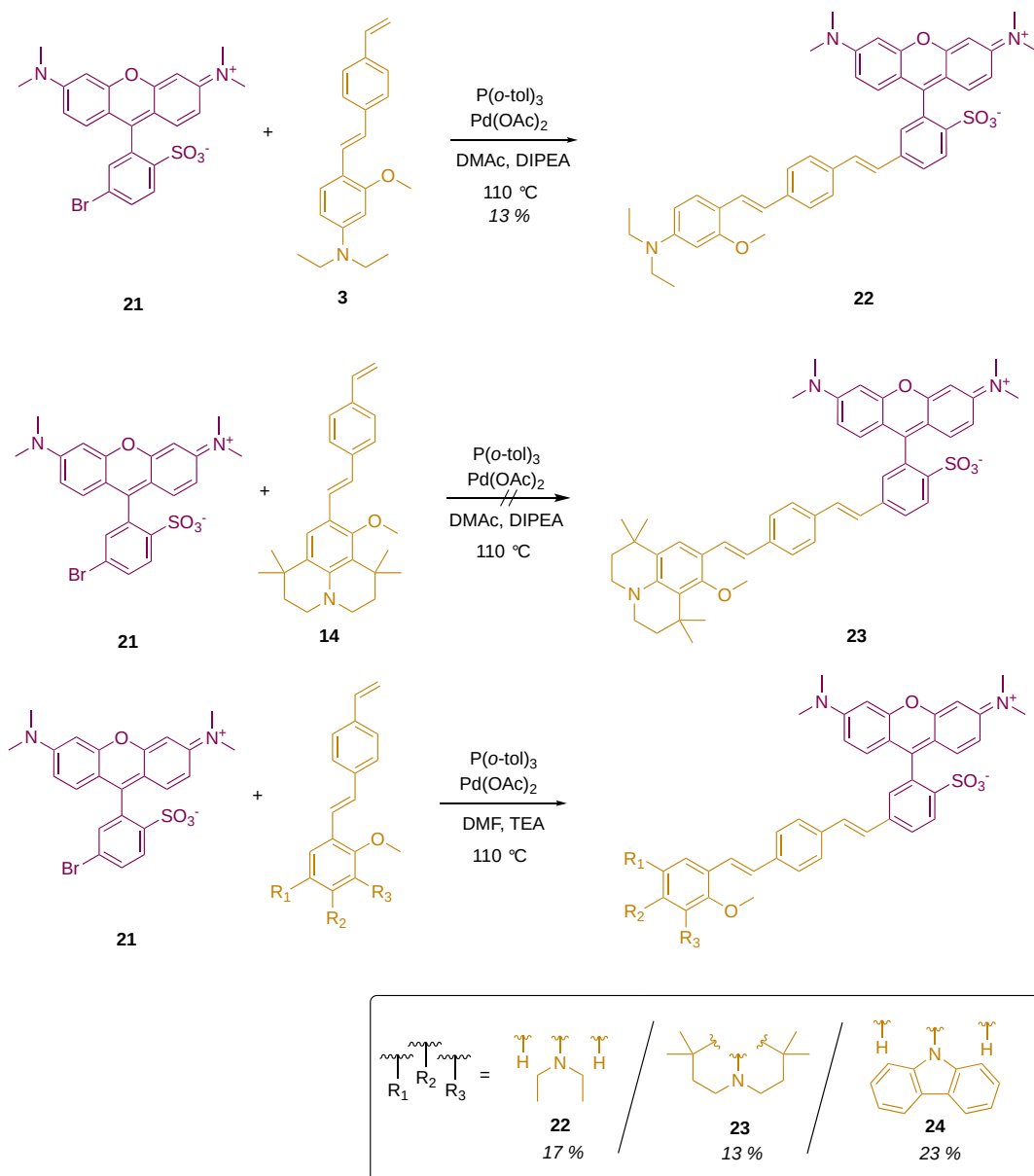
Sorszám	Reagensek	Reakciókörülmények	Termelés [%]
1	pTSA, propionsav	90 °C; 48 h	0
2	metánszulfonsav	120 °C; 24 h	6
3	DMF, trifluorecetsav	120 °C; 24 h	3
4	metánszulfonsav	1. 80 °C; 2h 2. 120 °C; 24 h	4
5 ^a	1. pTSA, propionsav 2. klóranyl, DKM	1. szh; sötét, 72 h 2. szh; 24 h	0
6	1. - 2. 85% H ₃ PO ₄ 3. 96% H ₂ SO ₄	1. 180 °C; 3h 2. 170 °C; 4h 3. 170 °C; 4h	5
7 ^a	1. 2,2,2-trifluoretanol 2. klóranyl, metanol	1. 80 °C; 16 h 2. reflux; 72 h	3
8	60% H ₂ SO ₄	150 °C; 20 h	18

3.4. A feszültségsszenzor intermedierek kapcsolása Heck-reakcióval

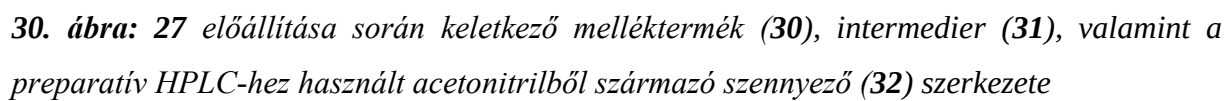
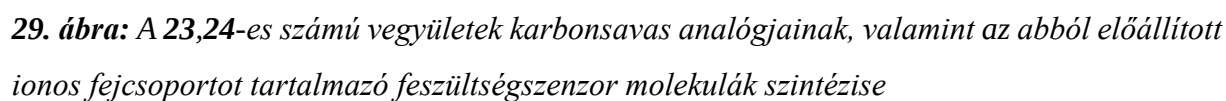
A horgony- és festékrészek előállítása után ezek összekapcsolását végeztem. Elsőként **22** és **23** előállítását végeztem el 7 szintézisének analógiájára (**28. ábra**), bár az előbbi irodalomban már ismert,⁴⁹ de az eltérő horgonyrésszel rendelkező festékek összehasonlításához elengedhetetlen. **23** esetében a reakciókörülmények nem voltak megfelelőek, ezért az alkalmazott oldószert és bázist megváltoztattam egy hasonló irodalmi példa alapján.³ Ennek segítségével sikeresen előállítottam 13%-os izolált termeléssel (**28. ábra**). Ez alapján elvégeztem mindhárom horgonyrész összekapcsolását **21**-gyel. A reakciókat inert atmoszférában, majd a tisztítást preparatív HPLC segítségével végeztem. Mindhárom anyag egy szilárd lila por volt, melyek oldata UV-lámpa alatt erős fluoreszcenciát mutat.

A szulfonsavas festékrész (**21**) előállítása jóval több szintetikus nehézséggel jár, mint a karbonsavas (**6**) esetében, valamint ezek Heck-kapcsolása is nehezebben, rosszabb termeléssel megy végbe. Azonban szerettem volna olyan feszültségsszenzorokat szintetizálni, amelyek tartalmazzák a szulfonsav-csoportot a spirociklizáció elkerülése és a kiemelkedő membránlokalizáció érdekében. A probléma megoldása céljából a szulfonsavat más pozícióba szerettem volna elhelyezni a molekulán, a karbonsav további kapcsolásán keresztül. Ennek érdekében előállítottam a **22-24** molekulák karbonsavval szubsztituált analógiáit (**29. ábra**), melyek már önmagukban is feszültségsszenzor molekulák. Tulajdonságaik azonban nem kiemelkedőek, érzékenyséjük nem elegendően nagy,³ ezért a tesztelések során ezeket nem vizsgáltam, hanem intermedierként alkalmaztam és további festékek előállításához használtam fel.

A szulfonsav-csoport bevitelét ACES kapcsolásával szerettem volna megoldani HATU kapcsolószer segítségével (**29. ábra**). **27** előállítását inert atmoszférában végeztem. Először **7**-et kevertettem DMF-ben HATU és DIPEA jelenlétében egy órán keresztül, hogy a karbonsav-csoportot aktiváljam, majd ezután adtam hozzá az ACES-t. A reakció egy éjszaka alatt játszódott le, majd a terméket preparatív HPLC segítségével tisztítottam. A reakció LC-MS nyomonkövetése során megfigyelhető volt egy melléktermék, valamint egy intermedier jelentős keletkezése a HATU-val való aktiválás hatásaként (**30. ábra**).

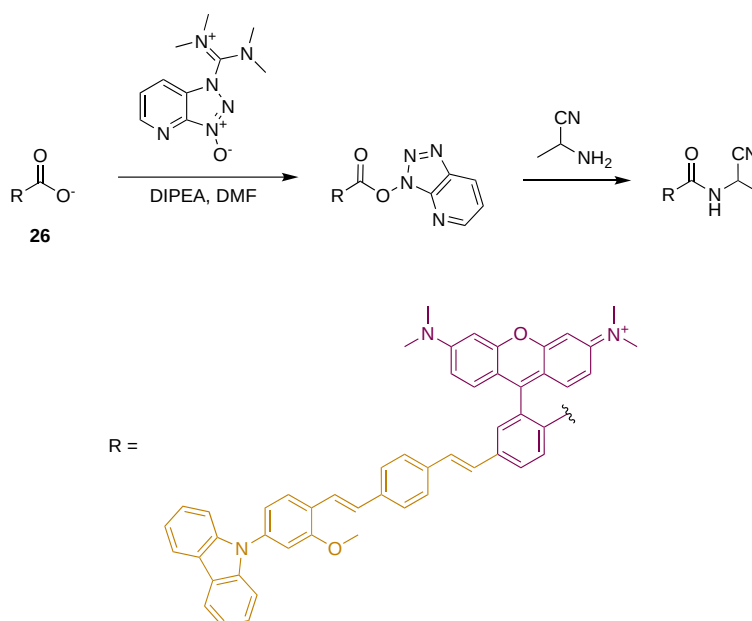


28. ábra: A szulfonsavas festékrészek és a horgonyrészek összekapcsolása Heck-reakciók segítségével különböző reakciókörülmények között



45

retenciós idővel rendelkező melléktermék. Ezenfelül a fentebb megállapított melléktermék (30) is keletkezett a HATU-val való reakció következtében. Sajnos a kiindulási anyag, 26 NMR spektrumában jelen volt egy cianid-aminos szennyező (32), amely a preparatív HPLC-hez használt acetonitrilből kerülhetett a termékbe (30. ábra). A HATU következtében beaktiválódott karbonsav ezzel a jelenlévő aminnal reagált el azonnal (31. ábra), hiszen az ACES-t csak egy órával később adtam hozzá.



31. ábra: A karbonsav aktiválása HATU kapcsolószerrel, majd reakciója az elegyben jelenlévő cianid-aminos szennyezővel

Ezek alapján 25 kapcsolásának elvégzésekor változtattam a reagensek adagolási sorrendjén a melléktermékek elkerülése érdekében, mivel abban is megtalálható volt a szennyező, valamint COMU kapcsolószerrel alkalmaztam. Az ACES-t és a bázist nagy feleslegben alkalmaztam, valamint már a COMU hozzáadása előtt a reakcióelegybe helyeztem, hogy a reagensek mennyiségének aránya szerint elreagálva a kiindulási anyaggal, többségben a kívánt termék keletkezzen. A reakció során a HPLC-MS eredménye alapján sikeresen előállítottam a 28-as számú vegyületet (29. ábra), azonban csak olyan kis mennyiségbe, hogy további vizsgálatokat nem tudtam vele elvégezni.

25-öt és 26-ot előállítottam megfelelő tisztaságú acetonitrilt alkalmazva, ezáltal szennyezőmentesen. 26-ból kiindulva szintetizáltam 29-et 27 analógiájára (29. ábra) dimetilacetamid oldószert alkalmazva. A HPLC-MS műszeren elvégzett mérés alapján a reakció sikeres volt, azonban a keletkezett mennyiség ebben az esetben sem volt elegendő

további analitikai vizsgálatok végrehajtásához, mivel a fentebb említett melléktermék (30. ábra) analógjai ebben az esetben is jelentős mennyiségben keletkeztek.

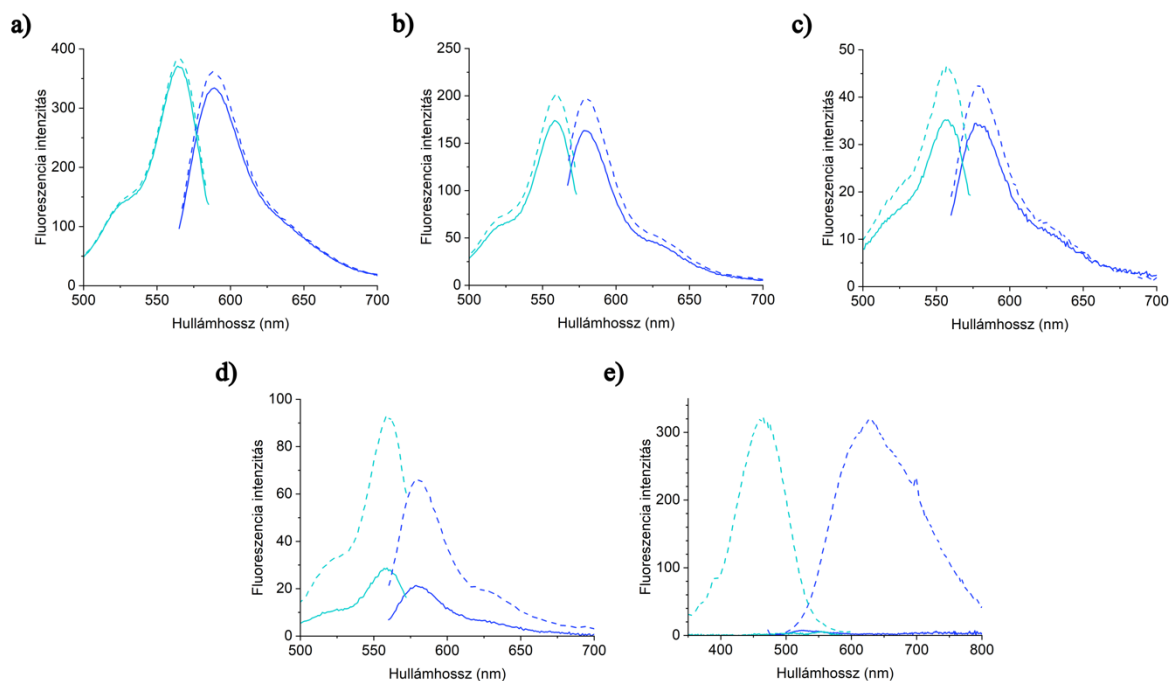
3.5. Feszültség szenzor molekulák tesztelési módszerének fejlesztése

A feszültség szenzor molekulák tesztelése elengedhetetlen a fejlesztési folyamataikhoz, azonban jelenleg csak időigényes, műszerigényes és biológiai szaktudást igénylő módszerek állnak a rendelkezésünkre. Ez jelentősen hátráltatja a festékek fejlesztésének haladását. Egy kémiai laboratóriumban kivitelezhető, egyszerű, reprodukálható vizsgálati módszer nagy előrelépés lenne a probléma megoldása felé. Ennek érdekében egy liposzóma alapú fluorimetriás mérési módszert vizsgáltam a munkám során.

A szenzorok előállításának fő célja a membránpotenciál változásának követése, ezáltal vizsgálatukhoz biztosítani kell ezen tényezőt. A membrán és a benne kialakuló potenciál modellezésére egy olyan rendszert hoztam létre, melyben a lipid kettősréteg két oldalán eltérő koncentrációjú K^+ -oldat található. A lipid kettősréteget lipid vezikula formájában állítottam elő, melyen belül 2,5 mM koncentrációjú K_2SO_4 -oldat volt jelen, míg a mérések során a külső oldat ennek század része vagy százszorosa volt. A potenciál kialakítása érdekében fázistranszfer katalizátorként a korábban Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem egyik kutatócsoportja által kifejlesztett BME44-et alkalmaztam, amely szelektív K^+ transzportra alkalmas. Nagyon fontos, hogy a használt ionofór csak a K^+ transzportját segítse elő, míg a H_3O^+ -ét nem, mely csökkentené a kialakult elektromos potenciálkülönbséget. A BME44 hatására a két oldalon lévő különböző K^+ koncentrációk elkezdnek kiegyenlítődni, melynek hajtóereje a kémiai potenciálkülönbség. Fázistranszfer katalizátor nélkül a lipid kettősréteg átjárhatatlan az ionok számára, azonban a BME44 lehetővé teszi a K^+ ionok diffúzióját a membránon. A nagyobb töménységű oldat oldalán a membránnál felgyűlnek a visszamaradt anionok, emiatt egy negatív töltés alakul ki. Ez megakadályozza a két oldalon a K^+ ionok tényleges kiegyenlítődéjét és egy elektromos potenciált hoz létre. A feszültség szenzorok működési elve alapján a kialakuló potenciál hatására növekedést vagy csökkenést kell tapasztalnunk a fluoreszcencia intenzitásában, melyet már egyszerű fluorimetriás készüléken is mérhetünk.

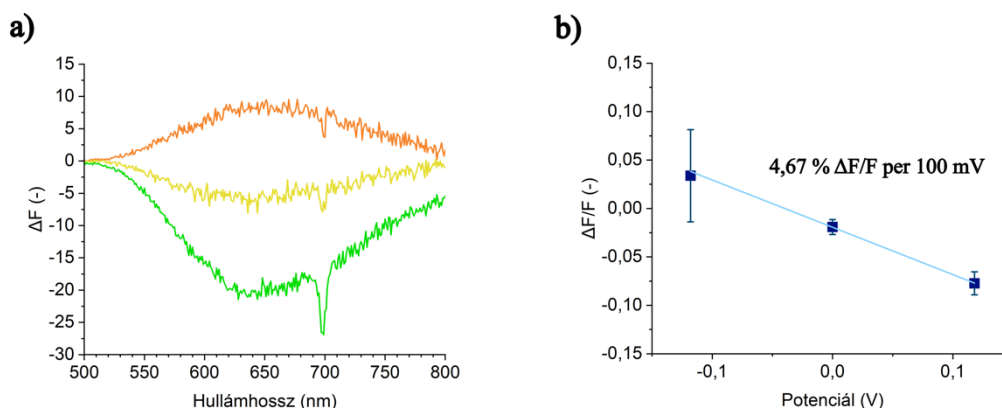
Az elkészített három új (23, 25, 27), valamint két irodalomban ismert (22⁴⁹ és di-4-ANNEPS²⁷) feszültség szenzor molekulának vizsgáltam a fluoreszcenciáját különböző K_2SO_4 oldatokban, majd ehhez hozzáadtam a liposzómákat is. Vizes oldatban az amfifil festékek

micellaserű aggregátumokat képeznek, melyekben az egyes festék molekulák kioltják egymás fluoreszcenciáját.⁸⁷ A lipid vezikulák hozzáadására megnő a rendszer fluoreszcencia intenzitása, tehát a molekulák lokalizálódnak a lipid kettősrétegben (**32. ábra**). Ezáltal bizonyítható, hogy az elkészített molekulák fluoreszcens anyagok és képesek a membránban való megfelelő lokalizációra.



32. ábra: Az elkészített festékek abszorpciós (világos kék) és emissziós (sötétkék) spektruma, ahol a szaggatott vonalak jelzik a liposzóma hozzáadása után mért értékeket a) 27, b) 22, c) 24, d) 23, e) di-4-ANNEPS esetében

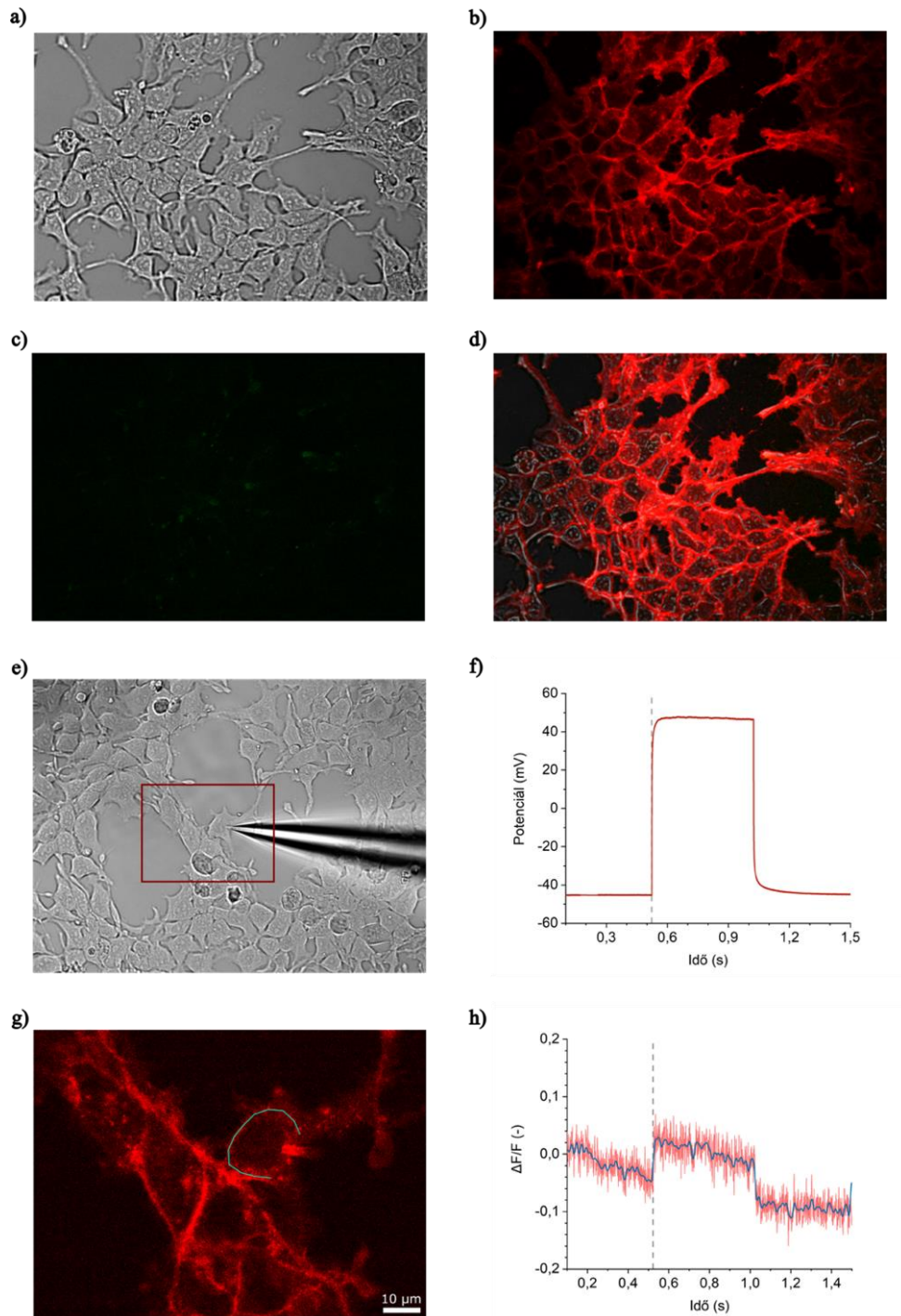
A di-4-ANNEPS²⁷ molekulán vizsgáltam a rendszer működőképességét. Mértem a biológiai rendszer fluoreszcencia intenzitását a festék oldatának jelenlétében három különböző, egy kisebb, egy egyenlő és egy nagyobb K^+ koncentrációjú külső oldat segítségével, majd a rendszerhez fázistranszfer katalizátort adtam és vizsgáltam a hatását. Az elvégzett három mérés eredményeit átlagoltam, amely alapján egyértelműen látszik, hogy a kifelé irányuló iontranszport hatására megnőtt a fluoreszcencia intenzitás, azonos koncentrációjú oldatok esetében nem igazán változott, míg befelé irányuló ionmozgás hatására csökkent az oldat fluoreszcenciája (**33. ábra**). A tesztelés során mért feszültségérzékenység 4,67% $\Delta F/F$ per 100 mV, amely bár elmarad az irodalomban írt körülbelül 10%-os értéktől,⁴ azonban igazolja a festék és a tesztelési módszer működőképességét. Ezenkívül megállapítható, hogy a növekvő potenciál hatására lineáris skálán változik a fluoreszcenciaintenzitás a vizsgált tartományon belül (**33. ábra**).



33. ábra: a) A BME44 hozzáadása után és előtt mért fluoreszcenciaintenzitások különbsége, ahol a külső K^+ koncentráció kisebb (narancssárga), azonos (citromsárga), nagyobb (zöld); ΔF : fluoreszcencia intenzitáskülönbség b) A fluoreszcencia intenzitás változása a kialakuló potenciál függvényében, valamint a mért intenzitásváltozások szórása

3.6. Biológiai tesztelés HEK sejtek segítségével

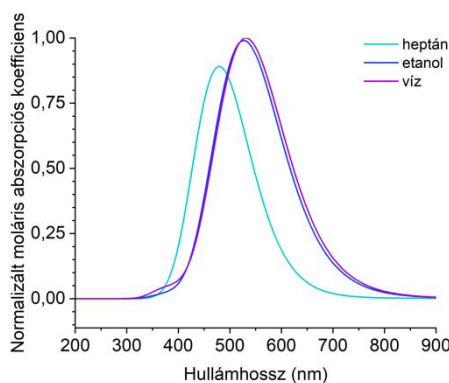
A BrainVisionCenter molekuláris biológus és neurobiológus munkatársai jóvoltából az egyik előállított feszültségszenzorral, a **23**-as molekulával biológiai tesztelés történt HEK293 sejtvonalon segítségével. A 3.5. fejezetben említett „patch-clamp” módszert alkalmazzák, és imitálják a membránpotenciál változását. A mérés elve, hogy egy elektródot tartalmazó üvegpipetta segítségével átszakították a sejtmembránt. A sejtközi térben található egy referencia elektród, amit felhasználva áram segítségével feszültséget hoztak létre a membránban. Ezalatt mikroszkóp használatával nyomon követték a feszültségszenzor fluoreszcencia intenzitásának változását a potenciálváltozás hatására. A mérések eredménye (**34. ábra**) alapján egyértelműen kijelenthető, hogy **23** képes a membránpotenciál változásra megfelelő gyorsasággal és $\sim 10\%$ $\Delta F/F$ per 100 mV érzékenységgel fluoreszcencia intenzitás változás jelet generálni. A mért érzékenység elmarad az irodalomban olvashatótól,⁴⁹ ennek oka, hogy a mérés eszközeinek beállítását tovább kéne optimalni, de ezalapján is ígéretes eredményeket kaptunk.



34. ábra: 22 tesztelése során a) a HEK sejtek kameraképe; b) a piros csatorna; c) a zöld csatorna, ahol a festék nem emittál, ezáltal csak gyenge autofluoreszcencia látható; d) a membránba lokalizálódott festék az a-c csatornák egyesítése alapján; e) a vizsgált sejt kiválasztása a pipetta segítségével, a kijelölt piros négyzet kinagyított képét láthatjuk a g panelen; g) a vizsgált sejt membránjának megfestése, a zölddel jelölt membrán a fluoreszcens válasz mérésére használt terület; f) a létrehozott membránpotenciál, h) valamint az ennek hatására létrejövő fluoreszcencia intenzitás változás, ahol pirossal jelölve az 5 egymást követő pásztázás átlagjele, míg kézzel zajszűrés utáni jel látható

3.7. Feszültségszenzorok fotokémiai tulajdonságainak vizsgálata kvantumkémiai számítások segítségével

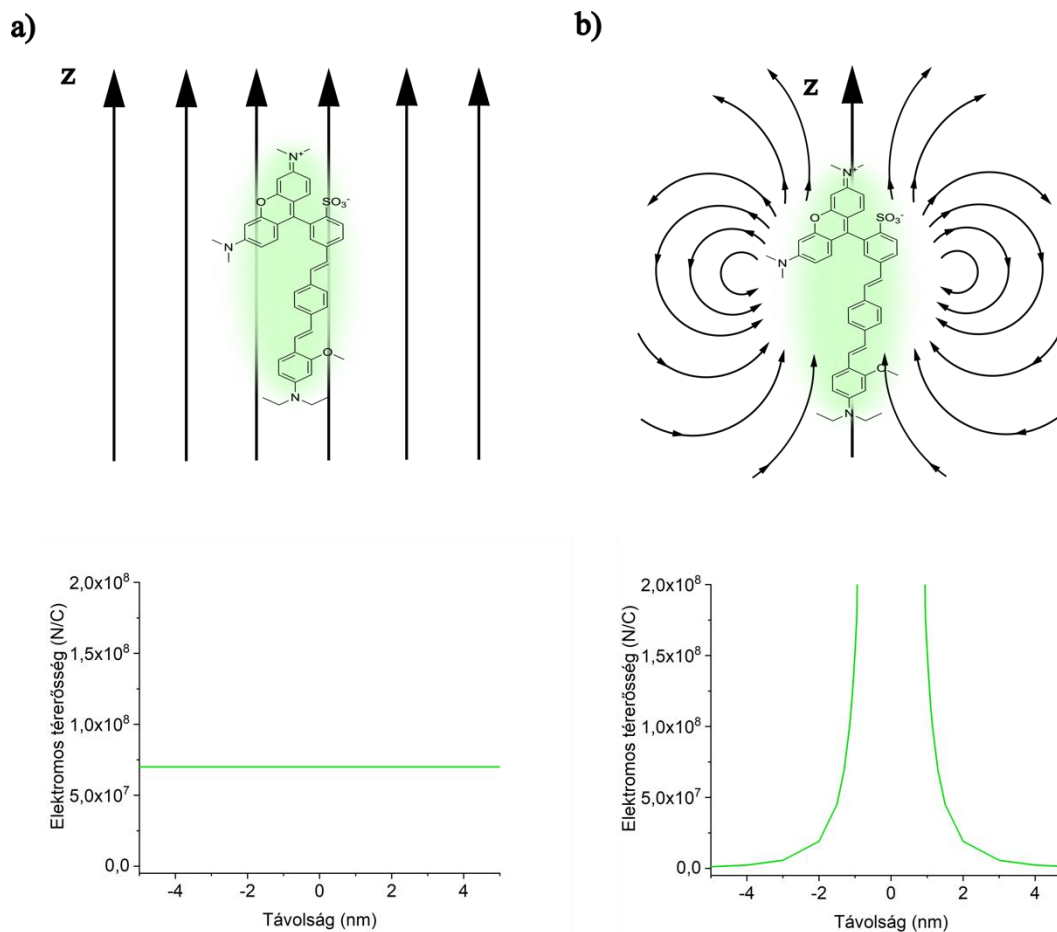
Az előállított feszültségszenzor molekulák fotokémiai tulajdonságainak megismerésére a Gaussian16 programot alkalmaztam, amely a kvantummechanika alaptörvényeit alkalmazza. Sűrűségfunkcionál elmélet számításokat végeztem a szintetizált molekulák modelljén, valamint a fotokémiai tulajdonságok predikcióját időfüggő számításokkal végeztem el. Elsőként a szoftverben modellezett molekula geometriai optimalizálását kiviteleztem alapállapotban, majd gerjesztési energiát számoltam. Ezek által megkaptam a molekula abszorpció (UV-VIS) spektrumát (35. ábra). Elsőként vizsgáltam 22 esetében, hogy az alkalmazott módszer segítségével mely oldószerben szolvatálva kapom a liposzómás tesztelés során mért értékeket legjobban reprezentáló eredményt. Ehhez háromféle oldószerben végeztem számításokat, heptánban, etanolban, valamint vízben. A kapott értékek alapján elmondható, hogy a víz esetében kaptam a mérthez legközelebb álló értéket, bár az etanol sem mutatott jelentős eltérést. Ez alátámasztja, hogy a membránban lokalizált festék fluorofór része a membránon kívül, poláris közegben helyezkedik el. Megjegyzendő azonban, hogy a mért értékek kb. 30 nm-rel eltérnek a számítottól. A továbbiakban az összes számolást vízben szolvatálva végeztem.



35. ábra: A vizsgált 22-es számú molekula számított abszorpciós spektruma különböző oldószerekkel szolvatálva

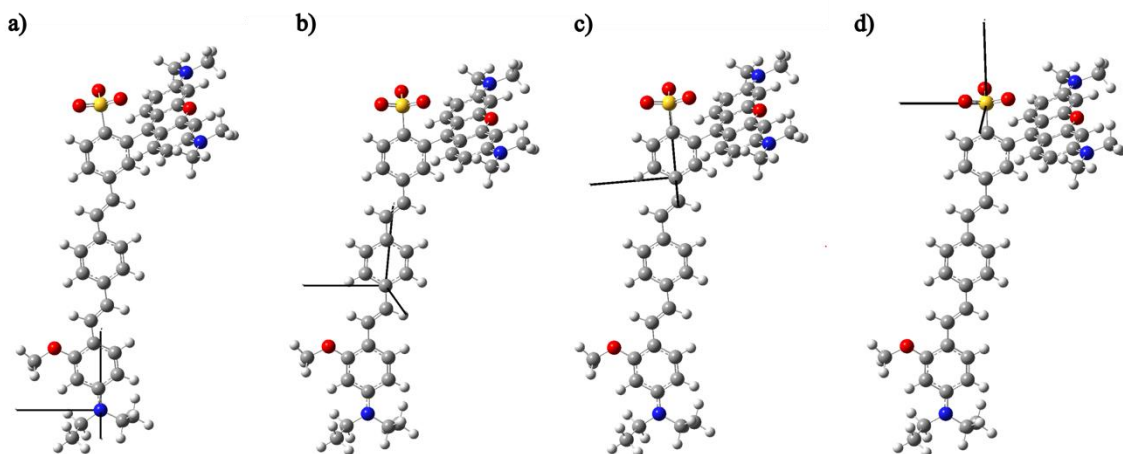
A számítások elvégzése során figyelembe vettem, hogy a feszültségszenzorok alkalmazása idegsejteken történik, tehát az arra jellemző körülmények között kell vizsgálnom a fotokémiai tulajdonságait. A neuronok sejtmembránjában homogén elektromos tér van, az elektromos térerősség abszolút értéke állandó, $70 \times 10^{-7} \text{ V m}^{-1}$. Azonban a program nem tud homogén elektromos térben számolni, emiatt olyan dipólust kellett alkalmazni, ami a membrán vastagságában (8-10 nm) hasonló elektromos térerősség értéket hoz létre. Erre alkalmas lehet a

0-20 atomi egység (a.u.: Hartree atomi egység, $1 \text{ a.u.} = 8,478 \times 10^{-30} \text{ C m}$) nagyságú dipólusmomentum (36. ábra).

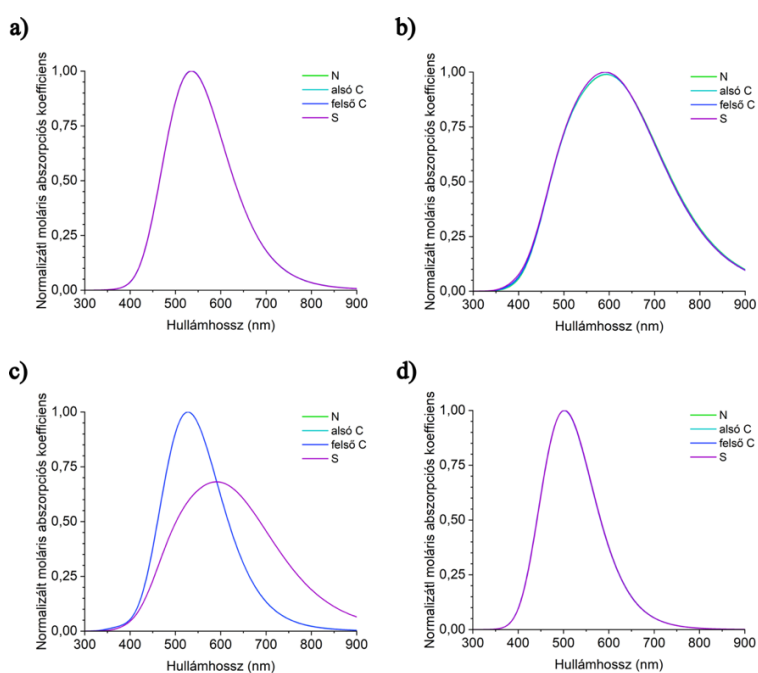


36. ábra: a) Homogén elektromos tér és az általa létrehozott elektromos térerősség nagysága különböző távolságok esetén; b) dipólus elektromos mezője és az 1 a.u. dipólusmomentumú dipólus által létrehozott elektromos térerősség

Az elektromos dipólus helyét a koordináta rendszer középpontjának helyzete határozza meg, ezért a különböző elhelyezkedésének hatását vizsgáltam a számított abszorpciós spektrumra. A molekula négy pontjában helyeztem el az origót, a nitrogénen, az alsó, felső szénen, illetve a kén atomon (37. ábra). A fentebb említett alapállapotú geometriai optimalizációt és gerjesztett állapotú frekvenciaszámítást a z-tengelyen pozitív és negatív irányú és különböző dipólusmomentumú elektromos tereken végeztem el. A prediktált UV-VIS spektrumok (38. ábra) alapján elmondható, hogy egy kiugró értéktől eltekintve, a koordináta-rendszer elhelyezkedése nincs hatással a számítások elvégzésére, ezáltal a számított abszorpciós értékekre sem.



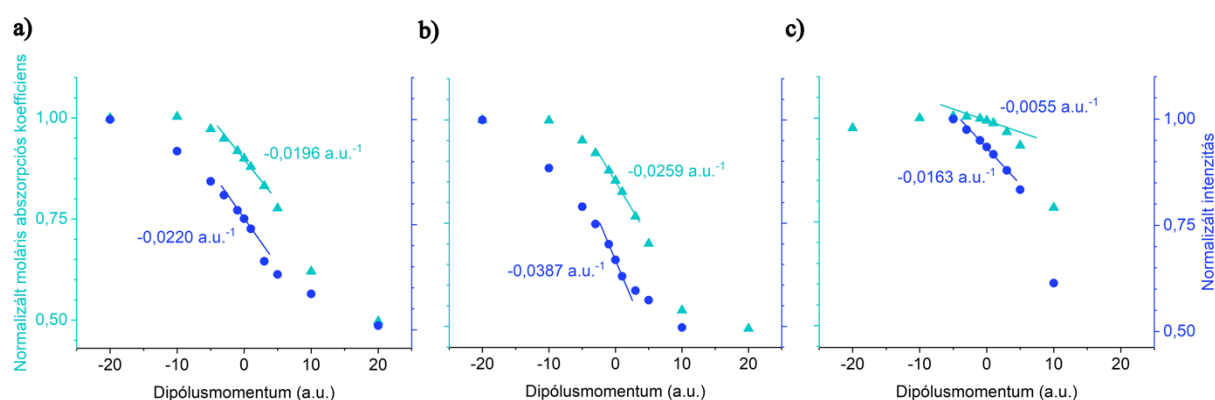
37. ábra: A koordinátarendszer különböző elhelyezései a Gaussian programban modellezett molekulákon; az origó elhelyezkedése: a) nitrogénatom (N); b) alsó szénatom (alsó C); c) felső szénatom (felső C); d) kénatom (S)



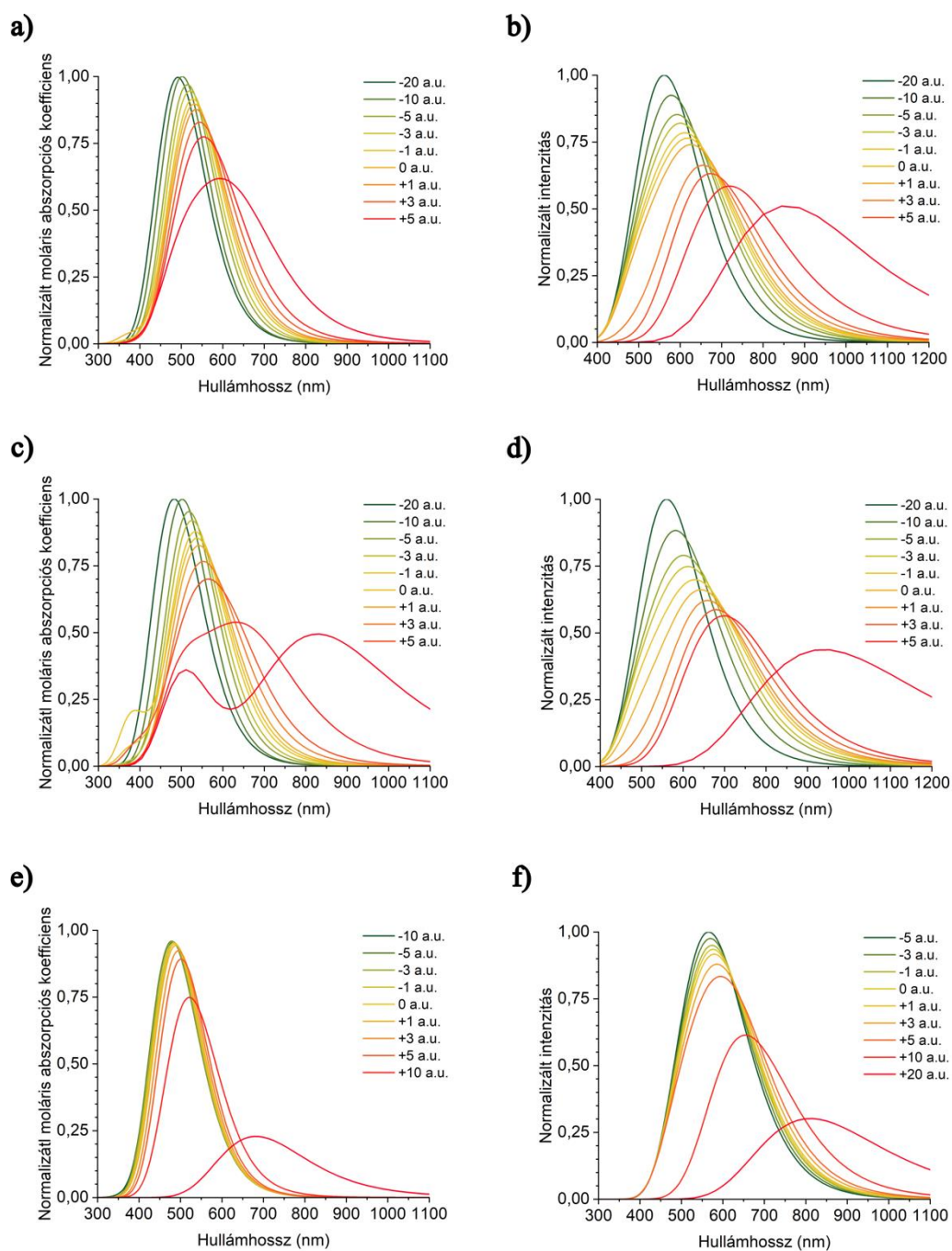
38. ábra: Koordinátarendszerek különböző helyzetének összehasonlítása sorrendben a) $z+1$; b) $z+10$; c) $z-1$; d) $z-10$ dipólusmomentum esetén a számított abszorpciós spektrumok segítségével

A különböző dipólusmomentumú elektromos tér vizsgálata céljából három előállított feszültség-szenzor 22, 23, 24 esetében 11 különböző dipólusmomentum beállítás mellett végeztem számításokat. Elsőként alapállapotú optimalizációt, gerjesztett állapotú frekvenciaszámítást, majd optimalizálást és végsőként alapállapotú frekvenciaszámítást. Az alapállapotban optimált geometriához gerjesztési hullámhosszok számolásával a molekulák

abszorpciós spektrumát, míg a gerjesztett állapotban optimált geometria gerjesztési hullámhosszainak számolásával az emissziós spektrumát közelítettem és ezáltal feltérképeztem a molekulák elektrokromicitását (**40. ábra**). A legnagyobb pozitív dipólus esetén számítottak értékeiből látható, hogy a növekvő dipólus csúcs kiszélesedést, majd csúcshasadást eredményez (**40. ábra**). Ez alapján egyértelműen látható, hogy a dipólus irányának és nagyságának változása arányosan változtatja a molekula abszorpciós és emissziós maximumát és a fluoreszcencia intenzitását (**39. ábra**). A -1–1 a.u. értékekre illesztett egyenesek alapján összehasonlíthatjuk a molekulák számított elektrokróm érzékenységének nagyságát. A **23**-as számú vegyület nagyobb, míg a **24**-es kisebb érzékenységet mutat, mint az irodalomban ismert, 44% $\Delta F/F$ per 100 mV érzékenységgel rendelkező **22**-es feszültség-szenzor.



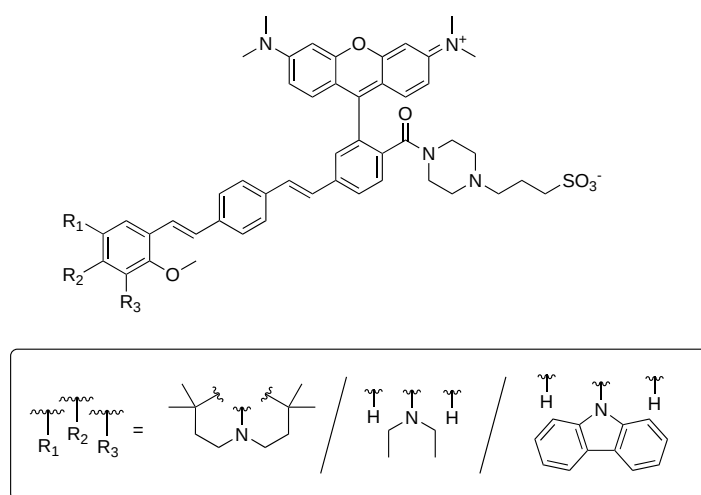
39. ábra: Az a) **22**, b) **23**, c) **24** molekulák abszorpciós (türkizkék) és emissziós (sötétkék) spektrumának maximumának változása a dipólusmomentum nagyságának változása függvényében, az ábrán jelölt színes számok a 0 a.u. körüli dipólusmomentum esetén kapott értékekre illesztett egyenes meredekségét jelölik



40. ábra: A számított abszorpció (a, c, e) és emisszió (b, d, f) spektrumok a 22 (a, b), 23 (c, d) és 24 (e, f) molekulák esetében

4. Jövőbeni tervek

A kutatómunkám folytatásaképp elsőként **28**-at és **29**-et szeretném nagyobb mennyiségben előállítani, NMR segítségével analitikailag igazolni. Ehhez természetesen szeretném vizsgálni az elvégzett reakciók alacsony termelékenységének okát, valamint megvalósítani a melléktermékek keletkezésének visszaszorítását. Ezt követően szeretném elvégezni **27-29** analógiájára további három feszültség-szenzor szintézisét egy másik szulfonsav-csoportot tartalmazó ionos fejcsoporttal való szubsztitúció segítségével (**41. ábra**).



41. ábra: A jövőben előállítani tervezett, eltérő ionos fejcsoporttal szubsztituált feszültség-szenzor molekulák szerkezetei

Az elkészített molekulák segítségével újabb fluorimetriás méréseket tervezek végezni lipid vezikulákon a tesztelési módszer továbbfejlesztése és a kapott molekulák feszültség-szenzor tulajdonságainak meghatározása céljából. Ezenkívül a kutatócsoportom biológiai osztályával közreműködésben szeretnénk a legígéretesebb festékek működésének vizsgálatát elvégezni HEK sejteken, illetve később in vitro és in vivo idegi szövetben.

Jövőbeni molekulák tervezése céljából tervezem vizsgálni a már előállított **22**, **23**, **24** molekulák alapján a PeT mechanizmus lejátszódásának lehetőségét kvantumkémiai számítások segítségével, valamint további hat potenciális feszültség-szenzor festék számításos kémiai feltérképezését. Ennek eredményei alapján szeretnék a jövőben újabb festékeket előállítani.

5. Kísérleti munka

5.1. A kísérletek során használt vegyszerek, eszközök és műszerek

A kísérletek elvégzése során kereskedelmi forgalomban kapható vegyszereket és oldószereket használtam, melyeket a következő cégektől szereztünk be: Sigma-Aldrich (Merck), Fluorochem (Doug Discovery), Molar Chemicals. A vásárolt anyagok kellő tisztaságúak voltak a felhasználáshoz, kivéve a 4-dimetilaminofenol, melyet előzetesen flash kromatográfia (0-35 % EtOAc-hexán, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Az inert körülmények között végzett reakciók esetén az inertizálást követő szilárd anyagok bemérése N₂ túlnyomás és N₂ áramlás mellett történt.

A mikrohullámú reaktorban elvégzett reakciókhoz az Anton Paar Monowave 450 típusú készüléket használtam. A reakciók követéséhez vékonyréteg kromatográfiát (VRK) alkalmaztam a Merck Kieselgel 60 F254-es szilikalappal, valamint alumínium-oxid lappal alumínium hordozón. Az eredmények detektálásához UV lámpát használtam. További reakcióanalízis RP-HPLC-UV/VIS-MS rendszerrel, a Shimadzu Nexera LC-40–LCMS-2020 típusú berendezéssel végeztem, elektropray ionizációval (ESI). A mérések elvégzéséhez négyfajta módszert alkalmaztam, mindegyik módszer esetében az oszlop típusa Supelco Ascentis Express 90 C18, 5 cm x 2,1 mm, 2 µm.

1.módszer: Az eluens áramlási sebessége: 0,8 ml/perc. Az A eluens 0,1 %-os TFA vizes oldata, B eluens 0,1% TFA acetonitriles oldata. A teljes módszer 8 perc, az elúciós gradiens a B eluensre nézve 5-95%-ra nőtt lineárisan 4 perc alatt.

2.módszer: Az eluens áramlási sebessége: 0,8 ml/perc. Az A eluens 0,4 g/l NH₄HCO₃ vizes oldata, B eluens acetonitril. A teljes módszer 13 perc. Az elúciós gradiens a B eluensre nézve 5-95%-ra nőtt lineárisan 4 perc alatt.

3.módszer: Az eluens áramlási sebessége: 0,5 ml/perc. Az A eluens 0,1 %-os TFA vizes oldata, B eluens 0,1% TFA acetonitriles oldata. A teljes módszer 11 perc. Az elúciós gradiens a B eluensre nézve 5-100%-ra nőtt lineárisan 5.7 perc alatt.

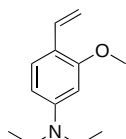
4.módszer: Az eluens áramlási sebessége: 0,8 ml/perc. Az A eluens 0,4 g/l NH₄HCO₃ vizes oldata, B eluens acetonitril. A teljes módszer 8 perc. Az elúciós gradiens a B eluensre nézve 5-100%-ra nőtt lineárisan 3.8 perc alatt.

A termékek tisztítását két műszer segítségével végeztem. A flash kromatográfiás elválasztást egy Interchim PuriFlash XS 520 Plus berendezésen, Puriflash Interchim PF-30SIHP szilika oszlopon végeztem a recepteknél feltüntetett oldószerek segítségével. A preparatív HPLC-s tisztításhoz pedig a Teledyne ACCQ Prep HP150 készüléket és Gemini 250 x 50,00 mm; 10 µm, C18, 110 töltött oszlopot használtam. Az alkalmazott oldószerek a reakciók részletes leírásánál láthatók.

Az előállított anyagok validálásához és tisztaságának meghatározásához NMR spektrumokat vettünk fel. A spektrumok 100/400 MHz térerősségű Varian Mercury Plus (Agilent Technologies), valamint 300/400/500/600 MHz térerősségű Varian Unity INOVA spektrométerrel készültek. Az értékek leírása során a kémiai eltolódást (δ) ppm-ben, a csatolási állandókat (J) Hz mértékegységben tüntettem fel. A multiplicitás jelölésére a következő rövidítéseket alkalmaztam; s: szingulett, d: dublett, t: triplett, q: kvartett, br: kiszélesedett jelek, m: multiplett. A horgonyrész előállítása során keletkezett intermedierek azonosítását néhány esetben csak RP-HPLC-UV/VIS-MS rendszer segítségével végeztem.

5.2. A reakciók elvégzésének részletes leírása

5.2.1. *N,N*-Dietyl-3-metoxi-4-vinilanilin



1

Egy gömblombikot inertizáltam N_2 segítségével, majd bemértem a Ph_3PMeBr -t (1620 mg, 4,54 mmol) és vízmentes THF-ben oldottam (10 ml). Az elegyet 15 percig kevertettem majd $KOtBu$ THF-es (1 M; 9,52 mmol; 9,52 ml) oldatát adtam hozzá tű segítségével. A reakcióelegy sárga színűvé változott. Ezután újabb 15 percig kevertettem, majd hozzáadtam az abszolút THF-ben (10 ml) feloldott 4-dietilamino-2-metoxibenzaldehidet. A reakció egy hétvégén keresztül keveredett, majd az oldószert vákuumban távolítottam el. A visszamaradt szilárd anyagot feloldottam ciklohexánban és üvegszűrőn szűrtem. Az elegyet vákuum rotabepárló segítségével szárítottam. Termelés: 82,8% (850 mg), narancssárga színű olaj.

Retenciós idő: 3,33 perc (1. módszer)

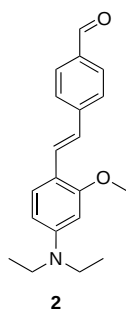
λ_{max} : 249 nm

Elméleti MW a $C_{13}H_{19}NO$ összegképletre számolva: 205,3010 Da

MS(ESI+): $MW(M+H)^+ = 206$ Da

Irodalom: 3

5.2.2. (E)-4-(4-(Dietilamino)-2-metoxisztiril)benzaldehyd



Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével, majd betöltöttem a 4-brómbenzaldehydet (1018 mg; 5,5 mmol) és a P(o-tol)₃-t (45,7 mg; 0,15 mmol). 1-et feloldottam vízmentes DMF-ben (10 ml), majd fecskendő és tű segítségével adtam hozzá az elegyhez. Ezután szintén tűvel mértem be a DIPEA-t (10 ml), végül pedig hozzáadtam a Pd(OAc)₂-ot (11,2 mg; 0,05 mmol). A reakciót 110 °C-on kevertettem egy hétvégén keresztül, majd lehűtöttem szobahőmérsékletre. Az elegyet toluollal átmostam egy másik lombikba, majd az oldószereket vákuumban távolítottam el. A termék tisztítását flash kromatográfia segítségével végeztem (0–20% EtOAc hexánban, lineáris gradiens). Termelés: 25% (390 mg), narancssárga színű olaj.

Retenciós idő: 3,62 perc (1. módszer)

λ_{max} : 345 nm

Elméleti MW a C₂₀H₂₃NO₂ összegképletre számolva: 309,1729 Da

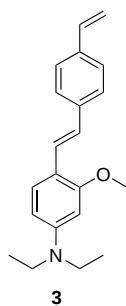
MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 310 Da

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9,94 (1H, s); 7,81 (2H, d, J =8,2 Hz); 7,63 – 7,54 (3H, m); 7,47 (1H, d, J =8,7 Hz); 6,96 (1H, d, J =16,3 Hz); 6,31 (1H, dd, J =8,8; 2,4 Hz); 6,17 (1H, d, J =2,5 Hz); 3,90 (3H, s); 3,40 (4H, q, J =7,1 Hz); 1,21 (6H, t, J =7,1 Hz)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 191,70; 158,90; 149,41; 145,52; 134,07; 130,23; 128,03; 127,59; 126,14; 122,30; 113,24; 104,52; 94,41; 55,35; 44,57; 12,73

Irodalom: 3

5.2.3. (E)-N,N-Dietil-3-metoxi-4-(4-vinilsztiril)anilin



Egy gömblombikot inertizáltam N₂-nel, majd megtöltöttem Ph₃PMeBr-dal (675 mg; 1,89 mmol). Vízmentes THF-et (5 ml) adtam hozzá, majd 15 percig kevertettem, hogy feloldódjon. Ezután KOtBu THF-es (1 M; 2,52 ml; 2,52 mmol) oldatát adagoltam hozzá. További 15 percig kevertettem az elegyet, majd 2-t feloldottam abszolút THF-ben (5 ml) és ezt is hozzáadtam. A reakció 5 órán át keveredett szobahőmérsékleten. Az oldószert vákuumban távolítottam el, majd ciklohexánban és néhány csepp THF-ben oldottam fel és szűrtem üvegszűrőn. További tisztítást végeztem flash kromatográfia (10% etil-acetát hexánban, izokratikus) segítségével. Termelés: 37% (142 mg), sárga szilárd anyag.

Retenciós idő: 4,04 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 334 nm

Elméleti MW a $C_{21}H_{25}NO$ összegképletre számolva: 307,1936 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 308 Da

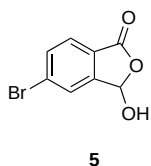
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,46 (2H, d, $J=8,1$ Hz); 7,41 (2H, d, $J=16,4$ Hz); 7,37 (2H, d, $J=8,0$ Hz); 6,92 (1H, d, $J=16,5$ Hz); 6,71 (1H, dd, $J=17,6$; 10,8 Hz), 6,32 (1H, dd, $J=8,7$; 2,4 Hz), 6,20 (1H, s); 5,74 (1H, d, $J=17,6$ Hz); 5,21 (1H, d, $J=10,9$ Hz); 3,89 (3H, s); 3,40 (4H, q, $J=7,0$ Hz); 1,21 (6H, t, $J=7,1$ Hz)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 158,52; 148,88; 138,78; 136,83; 135,64; 127,59; 126,52; 126,22; 123,86; 114,28; 112,87; 104,75; 95,0; 55,57; 44,68; 12,86

Irodalom: 3

5.2.4. 4-Bróm-2-formilbenzoesav

Egy gömblombikba bemértem 3,5-dibrómizobenzofurán-1(3*H*)-ont (3000 mg; 10,3 mmol)



majd vizet (150 ml) adtam hozzá és két órán keresztül refluxáltattam . A keletkező fehér szilárd anyagot üvegszűrőn szűrtem, vízzel mostam, majd vákuumban szárítottam. Termelés: 112% (2634 mg), fehér szilárd anyag. Az NMR spektrum alapján a mintában nincs túl sok víz és nem találhatók benne szerves szennyezők, ezért feltételeztem, hogy a túl magas termelést az üvegszűrőből származó szerves szennyezők okozzák. Ezek a további reakciókat nem zavarják, ezért nem végeztem további tisztítást.

Retenciós idő: 3,28 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 248 nm

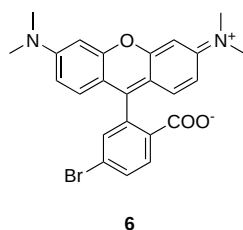
MS(ESI⁺): nem detektálható

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*D*₆): δ (ppm) 8,30 (1H, d, $J=6,7$ Hz); 7,94 (1H, d, $J=1,7$ Hz); 7,86 (1H, dd, $J=8,1$; 1,7 Hz); 7,77 (1H, d, $J=8,1$ Hz); 6,65 (1H, d, $J=3,2$ Hz)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*D*₆): δ (ppm) 168,06; 149,88; 134,22; 128,95; 127,45; 126,91; 126,27; 98,15

Irodalom: 3

5.2.5. 4-Bróm-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3*H*-xantén-9-il)benzoát



Egy gömblombikba bemétem 5-öt (500mg; 2,18 mmol), 3-dimetilaminofenolt (608 mg; 4,43 mmol) és p-toluolszulfonsav monohidrátot (83,1 mg; 0,437 mmol). Ehhez hozzáadtam propionsavat (30 ml), majd 90 °C-on kevertettem 19 órán keresztül. Mivel LC-MS analízis alapján volt még az elegyben kiindulási anyag, ezért adtam még hozzá 3-dimetilaminofenolt (650 mg; 4,738 mmol) propionsavban (15 ml) feloldva és további 22 órán keresztül melegítettem az elegyet. Ezután szobahőmérsékletre hűtöttem és az oldószert vákuumban távolítottam el. A terméket flash kromatográfia (5–10% MeOH DKM-ben, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 99% (1006 mg), lila szilárd anyag.

Retenciós idő: 4,37 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 557 nm

Elméleti MW a $C_{24}H_{21}BrN_2O_3$ összegképletre számolva: 464,0736/466,0736 Da

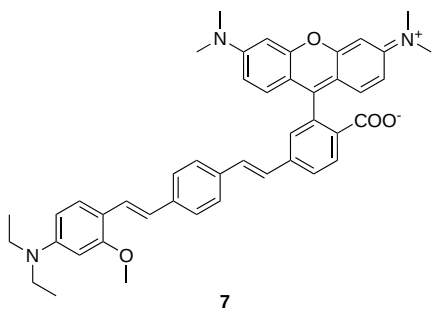
MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 465/467 Da

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,86 (1H, d, $J=8,2$ Hz); 7,70 (1H, dd, $J=8,2$; 1,6 Hz); 7,32 (1H, d, $J=1,6$ Hz); 6,64 (2H, d, $J=8,9$ Hz); 6,48 (2H, d, $J=2,5$ Hz); 6,42 (2H, dd, $J=8,9$; 2,6 Hz); 2,99 (12H, s)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 168,96; 154,49; 152,95; 152,28; 150,69; 132,88; 129,57; 128,79; 127,50; 126,71; 126,34; 108,87; 106,18; 98,42; 40,25

Irodalom: 3

5.2.6. 4-((*E*)-4-((*E*)-4-(Dietilamino)-2-metoxisztil)sztil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3*H*-xantén-9-il)benzoát



Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével, majd betöltöttem 6-ot (138 mg; 0,296 mmol), 3-at (70 mg; 0,228 mmol) vízmentes DMF-ben feloldva (10 ml), majd hozzáadtam P(*o*-tol)₃-t (20,8 mg; 0,0683 mmol), Pd(OAc)₂-ot (4,6 mg; 0,0205 mmol) és DIPEA-t (2,2 ml). A reakciót 110 °C-on kevertettem 19 óráig. Az oldószert vákuumban

eltávolítottam és a reakcióelegyet flash kromatográfia (5–15% MeOH-DKM, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 70% (110 mg), lila szilárd anyag.

Retenciós idő: 4,2 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 553 nm

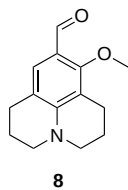
Elméleti MW a $C_{45}H_{45}N_3O_4$ összegképletre számolva: 691,3410 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 692 Da

HR-MS: MW(M+H)⁺ = 692,3444 Da; D = -5,63 ppm

Irodalom: 3

5.2.7. 8-Metoxi-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*-pirido[3,2,1-*ij*]kinolin-9-karbaldehid



DMF-ben (16 ml) feloldottam 8-hidroxijulolidin-9-karboxaldehidet (2000 mg; 9,21 mmol), majd CH_3I -t (1,43 ml; 23 mmol) és K_2CO_3 -ot (3817 mg; 27,6 mmol) adtam hozzá. A reakcióelegy egy hétvégén keresztül keveredett. Az elegyet vízre (200 ml) öntöttem, majd háromszor EtOAc-tal (100 ml) extraháltam. $MgSO_4$ segítségével szárítottam, majd szűrtem. A vizes fázis sárga, míg a szerves fázis narancssárga volt. A terméket flash kromatográfia segítségével tisztítottam (0–20% EtOAc hexánban, lineáris gradiens). Termelés: 94% (2010 mg), sárga szilárd anyag.

Retenciós idő: 3,84 perc (1. módszer)

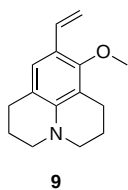
$\lambda_{\max}$: 369 nm

Elméleti MW a $C_{14}H_{17}NO_2$ összegképletre számolva: 231,1259 Da

MS : MW(M+H)⁺ = 232 Da

Irodalom: 88

5.2.8. 8-Metoxi-9-vinil-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*-pirido[3,2,1-*ij*]kinolin



Egy gömblombikot N_2 segítségével inertizáltam és megtöltöttem Ph_3PMeBr -dal (3104 mg; 8,69 mmol). Vízmentes THF-et (40 ml) adtam hozzá, majd 15 percig kevertettem. Ezután $KOtBu$ THF-es oldatát (1 M; 18,2 ml; 18,2 mmol) adagoltam hozzá, aminek hatására az elegy sárga színűvé változott. Újabb 15 percig kevertettem, miközben **8**-at feloldottam abszolút THF-ben (15 ml), majd ezt is hozzáadtam. A reakció szobahőmérsékleten keveredett egy hétvégén keresztül. A terméket flash kromatográfia (először 100% hexán, majd 10% EtOAc hexánban) segítségével tisztítottam. Termelés: 65% (1300 mg), sárga szilárd anyag.

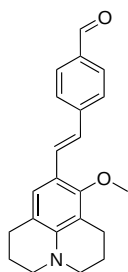
Retenciós idő: 9,13 perc (2. módszer)

$\lambda_{\max}$: 309 nm

Elméleti MW a $C_{15}H_{19}NO$ összegképletre számolva: 229,1467 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 230 Da

5.2.9. (E)-4-(2-(8-Metoxi-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*-pirido[3,2,1-*ij*]kinolin-9-il)vinil)benzaldehyd



10

Egy kétnyakú lombikot inertizáltam N₂ segítségével, majd megtöltöttem 4-brómbenzaldehyddel (1154 mg; 6,24 mmol) és P(*o*-tol)₃-nal (51,8 mg; 0,17 mmol). **9-et** feloldottam abszolút DMF-ben (12 ml), majd tű segítségével az elegyhez adagoltam. Ugyanígy DIPEA-t (12 ml) adtam hozzá, majd legutolsóként Pd(OAc)₂-ot (12,7 mg; 0,0567 mmol). A reakciót 110 °C-on melegítettem egy hétvégén keresztül. Vízre (100 ml) öntöttem, majd EtOAc-ot (100 ml) adtam hozzá és 3-szor mostam vízzel (100 ml). A szerves fázist elválasztottam, a kivált szilárd anyagot pedig DKM-ben oldottam fel és vízzel, majd DKM-mel mostam. A szerves fázisokat összegyűjtöttem, MgSO₄ segítségével megszárítottam, majd leszűrtem. A terméket flash kromatográfia (0–20% EtOAc hexánban) módszerrel tisztítottam tovább. Termelés: 1% (20 mg), sárga szilárd anyag. Retenciós idő: 4,88 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 359 nm

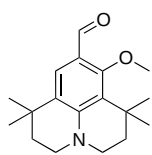
MS(ESI⁺): nem detektálható

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 9,95 (1H, s); 7,82 (1H, d, *J*=8,38 Hz); 7,72 (1H, d, *J*=8,34 Hz); 7,60 (1H, d, *J*=8,1 Hz); 7,52 (1H, d, *J*=7,8 Hz); 7,14 (1H, s); 6,93 (1H, d, *J*=16,3 Hz); 6,40 (1H, d, *J*=12,2 Hz); 3,74 (3H, s); 3,22 – 3,10 (4H, m); 2,72 – 2,82 (4H, m); 2,03 – 1,93 (4H, m)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 21,39; 21,95; 27,55; 29,69; 49,58; 49,85; 61,14; 116,63; 122,61; 124,32; 126,17; 127,51; 129,34; 130,27; 134,24; 144,34; 145,20; 155,30; 191,80; 150,67

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.10. 8-Metoxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*-pirido[3,2,1-*ij*]kinolin-9-karbaldehyd



11

Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével. Bemértem 8-hidroxi-1,1,7,7-tetrametiljulolidin-9-karboxialdehydet (2000 mg; 7,32 mmol) és K₂CO₃-ot (3033 mg; 21,9 mmol). Ezután fecskendő és tű segítségével adtam hozzá a CH₃I-t (1,14 ml; 18,3 mmol) és a DMF-et (15 ml). Az elegyet 22 órán át kevertettem. A reakció

lejátszódása után vízre (200 ml) öntöttem és EtOAc-tal (100 ml) háromszor extraháltam. MgSO₄ segítségével szárítottam, majd szűrtem és az oldószert vákuumban távolítottam el. Termelés: 100% (2121 mg), citromsárga szilárd anyag.

Retenciós idő: 4,52 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 365 nm

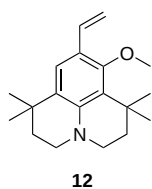
Elméleti MW a C₁₈H₂₅NO₂ összegképletre számolva: 287,1885 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 288 Da

HR-MS: MW(M)⁺⁺ = 287,1892 Da; D = 2,44 ppm; MW(M+H)⁺ = 288,1962 Da; D = 1,38 ppm

Irodalom: 90

5.2.11. 8-Metoxi-1,1,7,7-tetrametil-9-vinil-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*-pirido[3,2,1-*ij*]kinolin



12

Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével, majd megtöltöttem Ph₃PMeBr-dal (1318 mg; 3,69 mmol). Vízmentes tetrahydrofuránt (20 ml) adtam hozzá tű segítségével, majd 15 percig kevertettem, hogy a szilárd anyag feloldódjon.

Ezután KOtBu THF-es (1M; 7,5 ml; 7,5 mmol) oldatát adagoltam hozzá, ennek hatására az oldat sárga színűvé változott, majd újabb 15 percig kevertettem. Eközben **11**-et (1060 mg; 3,69 mmol) feloldottam abszolút THF-ben (15 ml) és ezt is hozzáadtam. A reakcióelegyet 21 órán keresztül kevertettem szobahőmérsékleten. Az oldószert vákuumban távolítottam el, majd a kapott koszos terméket használtam fel. Termelés: 43% (1053 mg), sárga szilárd anyag.

Retenciós idő: 4,99 perc (1. módszer)

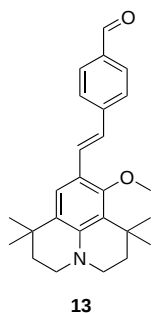
$\lambda_{\max}$: 377 nm

Elméleti MW a C₁₉H₂₇NO összegképletre számolva: 285,2093 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 286 Da

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.12. (E)-4-(2-(8-Metoxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-pirido[3,2,1-ij]knolin-9-il)vinil)benzaldehyd



A **12**-es reakcióelegyéhez inert atmoszférában hozzáadtam 4-brómbenzaldehydet (751 mg; 4,06 mmol), P(*o*-tol)₃-t (33,7 mg; 0,111 mmol), Pd(OAc)₂-ot (8,28 mg; 0,0369 mmol), DMF-et (8 ml) és DIPEA-t (8 ml). A reakciót 110 °C-on kevertettem egy hétvégéig. Vizet (100 ml) és EtOAc-ot (100 ml) adtam az elegyhez, majd mostam háromszor vízzel (100 ml), majd háromszor DKM-mel (30 ml). Az oldatot MgSO₄ segítségével szárítottam, majd az oldószert vákuumban távolítottam el. A terméket flash kromatográfiával (0–20% EtOAc hexánban, lineáris gradiens) tisztítottam. Termelés: 54% (780 mg), citromsárga szilárd anyag.

Retenciós idő: 4,93 perc (1. módszer)

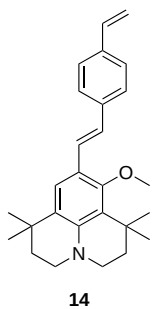
$\lambda_{\max}$: 399 nm

Elméleti MW a C₂₆H₃₁NO₂ összegképletre számolva: 389,2355 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 391 Da

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.13. (E)-8-Metoxi-1,1,7,7-tetrametil-9-(4-vinilsztiril)-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-pirido[3,2,1-ij]kinolin



Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével, majd bemértem Ph₃PMeBr-ot (1073 mg; 3 mmol), amit THF-ben (6 ml) oldottam. Az elegyet 15 percig kevertettem, majd KO^tBu THF-es oldatát (1M; 4 ml; 4 mmol) adtam hozzá. További 15 perc kevertetés után **13**-at (780 mg; 2 mmol) oldottam abszolút THF-ben (6 ml), majd hozzáadtam az elegyhez. A reakciót 18 órán keresztül kevertettem. A HPLC-MS mérés alapján a konverzió nem volt teljes, ezért

további reagenst készítettem, az első két lépést megismételtem, majd az elegyet hozzáadtam a reakcióhoz és további 20 óráig kevertettem. Az oldószert vákuumban távolítottam el és a terméket flash kromatográfia (3% EtOAc hexánban, izokratikus gradiens) segítségével végeztem. Termelés: 79% (385 mg), citromsárga szilárd anyag.

Retenciós idő: 5,59 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 331 nm

Elméleti MW a C₂₇H₃₃NO összegképletre számolva: 387,2562 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 388 Da

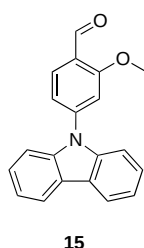
HR-MS: $MW(M+H)^+ = 388,2649$ Da; $D = 3,61$ ppm

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7,47 (2H, d, $J=8,3$ Hz); 7,39 (2H, d, $J=8,3$ Hz); 7,32 (1H, s); 7,27 (1H, d, $J=16,3$ Hz); 6,85 (1H, d, $J=16,3$ Hz); 6,71 (1H, dd, $J=17,6; 10,9$ Hz); 5,74 (1H, d, $J=17,6$ Hz); 5,22 (1H, d, $J=11,0$ Hz); 3,78 (3H, s); 3,16 (2H, t, $J=5,8$ Hz); 3,10 (2H, t, $J=5,7$ Hz); 1,80 – 1,72 (4H, m); 1,44 (6H, s); 1,33 (6H, s)

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 136,72; 127,08; 126,64; 126,24; 126,02; 125,62; 123,23; 121,40; 116,23; 113,19; 62,65; 47,64; 47,18; 40,35; 37,03; 32,90; 32,53; 31,77; 30,62; 28,75

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.14. 4-(9H-Karbazol-9-il)-2-metoxibenzaldehid



Az anyagot kétféleképpen állítottam elő sikeresen:

1. Egy mikrohullámú reaktorhoz alkalmas reakcióedénybe betöltöttem karbazolt (450 mg; 2,69 mmol), 4-bróm-2-metoxibenzaldehidet (868 mg; 4,04 mmol), $Pd_2(dba)_3$ -ot (197 mg; 0,215 mmol), $NaOtBu$ -ot (517 mg; 5,38 mmol), $RuPhos$ (201 mg; 0,431 mmol) katalizátort és toluolt (14 ml). A reakció 1 órán keresztül 120 °C-on keveredett a mikrohullámú reaktorban. Az oldószert vákuumban távolítottam el, majd a terméket flash kromatográfia segítségével tisztítottam. Termelés: 26% (210 mg).

2. Egy gömblombikot inertizáltam N_2 segítségével, majd bemértem 4-bróm-2-metoxibenzaldehidet (868 mg; 4,04 mmol) karbazolt (450 mg; 2,69 mmol), fém rézport (992 mg; 15,6 mmol) és előre megszárított K_2CO_3 -ot (372 mg; 2,69 mmol). Vízmentes DMF-et (5 ml) adtam hozzá, majd 23 órán keresztül refluxáltattam. 5 ml vizet adtam hozzá, majd EtOAc segítségével celiten szűrtem. Az elegyet kétszer mostam vízzel, majd telített $NaCl$ oldattal, majd $MgSO_4$ segítségével szárítottam. Az oldószert vákuumban távolítottam el és a terméket flash kromatográfiával (0–20% EtOAc hexánban, lineáris gradiens) tisztítottam. Termelés: 74% (600 mg), sárga szilárd anyag.

Retenciós idő: 4,75 perc (3. módszer)

λ_{max} : 340 nm

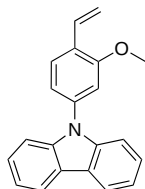
MS(ESI⁺): nem detektálható

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 10,53 (1H, s); 8,15 (2H, d, $J=7,7$ Hz); 8,09 (1H, d, $J=8,2$ Hz); 7,54 (2H, d, $J=8,2$ Hz); 7,49 – 7,40 (2H, m); 7,38 – 7,22 (4H, m); 3,97 (3H, s)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 188,72; 162,93; 140,04; 130,24; 126,30; 123,92; 123,39; 120,76; 120,53; 118,75; 109,87; 109,68; 56,05

Irodalom: 91

5.2.15. 9-(3-Metoxi-4-vinilfenil)-9H-karbazol



16

Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével, majd bemértem Ph₃PMeBr-ot (237 mg; 0,664 mmol). Vízmentes THF-ben (2 ml) oldottam fel és 15 percen keresztül kevertettem. KOtBu THF oldatát (1 mol/L; 1,39 ml) tű segítségével adtam hozzá, majd újabb 15 percig keveredett. Végül **15**-öt (200 mg) THF-ben (3 ml) oldottam és oldat formájában adtam az elegyhez. 20 órán keresztül kevertettem. A terméket flash kromatográfia (100% hexán; alumínium-oxid oszlopon) segítségével tisztítottam. Termelés: 14% (210 mg), sárga szilárd anyag.

Retenciós idő: 7,34 perc (3. módszer)

λ_{max}: 292 nm

Elméleti MW a C₂₁H₁₇NO összegképletre számolva: 299,1310 Da

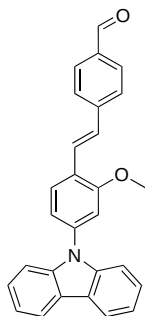
MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 300 Da

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8,19 – 8,12 (2H, m); 7,69 (1H, d, *J*=8,1 Hz); 7,48 – 7,38 (2H, m); 7,34 – 7,23 (3H, m); 7,19 – 7,05 (3H, m); 5,86 (2H, dd, *J*=17,8; 1,5 Hz); 5,38 (1H, dd, *J*=11,2; 1,5 Hz); 3,87 (3H, s)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 157,64; 140,79; 138,02; 130,97; 127,54; 126,01; 125,98; 123,35; 120,33; 119,94; 119,18; 115,21; 109,88; 109,68; 55,77

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.16. (E)-4-(4-(9H-Karbazol-9-il)-2-metoxisztil)benzaldehyd



17

Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével, majd bemértem 4-brómbenzaldehydet (440 mg; 2,38 mmol) és P(*o*-tol)₃-t (19,8 mg; 0,0649 mmol). **16**-ot (648 mg) DMF-ben (20 ml) oldva, majd DIPEA-t (20 ml) és Pd(OAc)₂-ot (4,86 mg; 0,0216 mmol) adtam hozzá. A reakcióelegyet 1 napig refluxáltattam 110 °C-on. Az oldószert vákuumban távolítottam el, majd a terméket flash kromatográfiával (0–20% EtOAc hexánban, lineáris gradiens) tisztítottam. Termelés: 64% (53,5 mg), sárga szilárd anyag.

Retenciós idő: 5,79 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 363 nm

Elméleti MW a $C_{28}H_{21}NO_2$ összegképletre számolva: 403,1572 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 404 Da

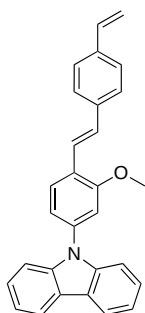
HR-MS: MW(M+H)⁺ = 404,1655 Da; D = 2,47 ppm

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 10,02 (1H, s); 8,19 – 8,14 (2H, m); 7,93 – 7,87 (2H, m); 7,83 (1H, d, $J=8,2$ Hz); 7,77 – 7,68 (3H, m); 7,53 – 7,39 (4H, m); 7,36 – 7,20 (4H, m); 7,13 (1H, d, $J=2,0$ Hz); 3,93 (3H, s)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 191,70; 158,15; 143,91; 140,65; 138,72; 135,26; 130,27; 128,29; 127,79; 127,03; 126,27; 126,05; 124,84; 123,48; 120,40; 120,13; 119,28; 109,87; 109,75; 55,88

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.17. (E)-9-(3-Metoxi-4-(4-vinilstiril)fenil)-9H-karbazol



18

Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével, majd bemértem Ph₃PMeBr-ot (207 mg; 0,58 mmol) és vízmentes THF-et (7 ml). 15 percig kevertettem, majd KOtBu THF-os (1 mol/L; 1,22 ml) oldatát adtam hozzá. Újabb 15 percig keveredett, majd THF-ben (8 ml) feloldott **17**-et (234 mg; 0,58 mmol) adtam hozzá. A reakcióelegy 1 napig keveredett. Az oldószert vákuumban távolítottam el, a terméket flash kromatográfia (0–20% EtOAc hexánban, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 59% (138 mg), sárga szilárd anyag.

Retenciós idő: 6,16 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 346 nm

Elméleti MW a $C_{29}H_{23}NO$ összegképletre számolva: 401,1780 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 402 Da

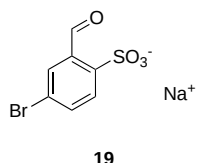
HR-MS: MW(M)⁺ = 401,1785 Da; D = 1,25 ppm; MW(M+H)⁺ = 402,1853 Da; D = 0,25 ppm

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8,20 – 8,13 (2H, m); 7,81 (1H, d, $J=8,2$ Hz); 7,53 – 7,59 (3H, m); 7,51 – 7,41 (6H, m); 7,31 (2H, ddd, $J=8,0$; 6,8; 1,2 Hz); 7,24 (1H, d, $J=8,6$ Hz); 7,20 (2H, m); 7,10 (1H, d, $J=1,9$ Hz); 5,88 – 5,70 (1H, m); 5,30 – 5,25 (1H, m); 3,91 (3H, s)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 157,79; 140,78; 137,81; 137,34; 136,89; 136,50; 129,36; 127,33; 126,83; 126,56; 126,00; 125,72; 123,40; 122,59; 120,35; 119,99; 119,30; 113,72; 109,91; 109,74; 55,84

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.18. 4-Bróm-2-formilbenzolszulfonát



Egy mikrohullámú reaktorhoz használható reakcióedénybe töltöttem 5-bróm-2-fluorbenzaldehydet (1500 mg; 7,39 mmol), majd 1:1 arányú víz (7 ml), EtOH (7 ml) elegyben oldottam. Hozzáadtam Na₂S₂O₅-ot (618 mg; 3,25 mmol), valamint NaOH-ot (236 mg; 5,91 mmol) és a reakcióelegyet 16 órán keresztül a mikróban reagáltattam 140 °C-on. A kész elegyet MeOH-ra (21 ml, a víz a teljes elegy 20%-a legyen) öntöttem, aminek hatására a szervesetlen szennyezők csapadékot alkottak. Ezeket üvegszűrő segítségével kiszűrtem, majd az oldószert vákuumban távolítottam el. A szilárd keverékhez MeOH-t és dietil-étert adagoltam 1:2 arányban, majd üvegszűrőn szűrtem és mostam. Termelés: 100% (2121 mg), fehér szilárd anyag.

Retenciós idő: 0,96 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 252 nm

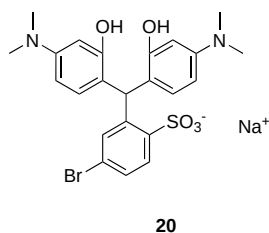
MS(ESI⁺): nem detektálható

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) 10,78 (1H, s); 7,83/7,81 (2H, m); 7,76/7,74 (1H, m)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO): δ (ppm) 192,75; 149,26; 136,07; 134,59; 129,74; 129,35; 122,87

Irodalom: 49

5.2.19. 2-(Bisz(4-(dimetilamino)-2-hidroxifenil)metil)-4-brómbenzolszulfonát



Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével, majd bemértem **19**-et (200 mg; 0,697 mmol) és 3-dimetilaminofenolt (215 mg; 1,57 mmol). 2,2,2-trifluoretanolt (6 ml) adtam hozzá, majd 16 órán keresztül 80 °C-on kevertettem. Az oldószert vákuumban távolítottam el. A HPLC-MS alapján a termék eléggé tiszta volt a következő lépéshez (**1. táblázat 7.**).

Termelés: 100% (379 mg), lila szilárd anyag.

Retenciós idő: 4,27 perc (4. módszer)

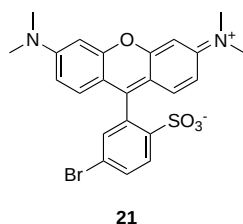
$\lambda_{\max}$: 256 nm

Elméleti MW a C₂₃H₂₄BrN₂O₅S összegképletre számolva: 519,0595/521,0595 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 521/523

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.20. 4-Bróm-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3*H*-xantén-9-il)benzolszulfonát



A terméket hatféleképpen állítottam elő sikeresen:

19-et (1000 mg; 3,48 mmol) és 3-dimetilaminofenolt (1195 mg; 8,71 mmol) oldottam metánszulfonsavban (12 ml), majd 120 °C-on kevertettem egy napon keresztül. A reakció lejátszódása után az elegyet lehűtöttem szobahőmérsékletre és MeOH adtam hozzá a szilárd anyagok feloldásáig. Ezután vízre öntöttem, majd NaOH oldattal semlegesítettem. Kétszer mostam DKM-mel, majd DKM és metanol (10:3) elegyével, MgSO₄-tal szárítottam, szűrtem és az oldószert vákuumban távolítottam el. A terméket flash kromatográfiával (0–10% MeOH-DKM, lineáris gradiens) tisztítottam. Termelés: 7% (118 mg) (**1. táblázat 2.**).

19-et (1000 mg; 3,48 mmol) és 3-dimetilaminofenolt (956 mg; 6,97 mmol) oldottam DMF-ben (35 ml), ezután trifluorecetsav vizes oldatát (0,5 mol/l; 3,5 ml) adtam hozzá és egy éjszakán át szobahőmérsékleten, majd egy napig 120 °C-on kevertettem. Az oldószert vákuumban távolítottam el, a terméket flash kromatográfiával (0–10% MeOH-DKM, lineáris gradiens) tisztítottam. Termelés: 3% (60 mg) (**1. táblázat 3.**).

19-et (1000 mg; 3,48 mmol) és 3-dimetilaminofenolt (1195 mg; 8,71 mmol) oldottam metánszulfonsavban (12 ml). 80 °C-on kevertettem két órán keresztül, majd levegőztettem és 120 °C-on egy napon keresztül melegítettem. Az elegy szobahőmérsékletre hűtése után vízre öntöttem és háromszor mostam DKM és MeOH elegyével (10:1). MgSO₄ segítségével szárítottam, majd szűrtem és az oldószert vákuumban távolítottam el. A terméket flash kromatográfiával (0–10% MeOH-DKM, lineáris gradiens) tisztítottam. Termelés: 4% (36,7 mg) (**1. táblázat 4.**).

19-et (200 mg; 0,697 mmol) és 3-dimetilaminofenolt (119 mg; 0,867 mmol) N₂ atmoszférában 3 órán keresztül 180 °C-on kevertettem. Ezután további 3-dimetilaminofenolt (80 mg; 0,583 mmol) és 85%-os H₃PO₄ vizes oldatát (1 ml) adtam hozzá, 4 órán keresztül 170 °C-on melegítettem. Az elegyben jellemzően **20** volt jelen, ezért 96%-os H₂SO₄ vizes oldatát (1ml) adtam hozzá és további 4 órát fűtöttem. A reakció lejátszódását követően MeOH-t (20 ml) és vizet (14 ml) adtam hozzá, amivel szobahőmérsékleten négy órát kevertettem. Az elegyet ötször mostam DKM és MeOH elegyével (10:1), majd MgSO₄-tal szárítottam, szűrtem. Az oldat semlegesítésére Et₃N-t (1 ml) adtam hozzá, majd az oldószert vákuumban távolítottam el. A

terméket flash kromatográfiával (0–10% MeOH-DKM, lineáris gradiens) tisztítottam. Termelés: 6% (23,4 mg) (**1. táblázat 6.**).

20-at (379 mg; 0,697 mmol) és klóranilt (343 mg; 1,39 mmol) feloldottam MeOH-ban (44 ml), majd 72 órán keresztül refluxáltattam. Az elegy szobahőmérsékletre hűtése után üvegszűrőn szűrtem és MeOH-lal mostam. Az oldószert vákuumban távolítottam el. A visszamaradt szilárd anyagot EtOAc-tal eldörzsöltem, a kivált szilárd anyagot üvegszűrőn szűrtem. Termelés: 3% (9,9 mg) (**1. táblázat 7.**).

19-et (200 mg; 0,697 mmol) és 3-dimetilaminofenolt (191 mg; 1,39 mmol) oldottam H₂SO₄ 60%-os vizes oldatában (2,4 ml), majd 20 órán keresztül kevertettem 120 °C-on. A reakcióelegyet lehűtöttem szobahőmérsékletre, majd NaHCO₃ és 40%-os NaOH oldat segítségével körülbelül 7-esre állítottam be a pH-ját. A kivált csapadékot üvegszűrőn szűrtem, majd toluollal mostam, szárítottam. A vizes fázisban is volt egy kevés a termékből. A kapott szilárd anyagot meleg etanolban oldottam fel, majd újra üvegszűrőn szűrtem. Az oldószert vákuumban távolítottam el és a terméket flash kromatográfia (0–13% MeOH-DKM, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 18% (63 mg), lila szilárd anyag (**1. táblázat 8.**). Retenciós idő: 4,13 perc (1. módszer)

λ_{max} : 559 nm

Elméleti MW a C₂₃H₂₁BrN₂O₄S összegképletre számolva: 500,0405/502,0405 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 501/503 Da

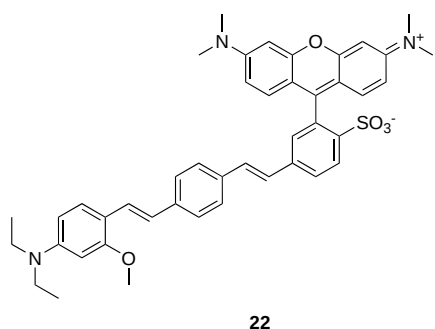
HR-MS: MW(M+H)⁺ = 501,0490/503,0472 Da; D = 2,40 ppm

¹H NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 7,92 (1H, d, $J=8,5$ Hz); 7,84 (1H, dd, $J=8,4$; 2,1 Hz); 7,51 (1H, d, $J=2,1$ Hz); 7,07 (2H, dd, $J=9,5$; 2,1 Hz); 7,03 (2H, d, $J=9,5$ Hz); 6,89 (2H, d, $J=2,1$ Hz); 3,25 (12H, s)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 158,33; 157,34; 157,25; 146,84; 132,85; 132,79; 131,83; 130,26; 122,14; 114,30; 114,26; 96,09; 40,90

Irodalom: 49

5.2.21. 4-((*E*)-4-((*E*)-4-(Dietilamino)-2-metoxisztil)sztil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3*H*-xantén-9-il)benzolszulfonát



Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével és bemértem **21**-et (74,1 mg; 0,148 mmol), **3**-at (50 mg; 0,163 mmol), P(*o*-tol)₃-t (9 mg; 0,0296 mmol), majd ezeket oldottam vízmentes DMF-ben (2,02 ml) és TEA-ban (1,03 ml). Végül Pd(OAc)₂-ot (2,99 mg; 0,0133 mmol) adtam hozzá és 20 órán keresztül 110 °C-on kevertettem. A

reakciót lehűtöttem szobahőmérsékletre és az oldószert vákuumban távolítottam el. A terméket preparatív HPLC (30-60% MeCN, 0,02% TFA-s víz, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 17% (18 mg), lila szilárd anyag.

Retenciós idő: 3,89 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 555 nm

Elméleti MW a C₄₄H₄₅N₃O₅S összegképletre számolva: 727,3080 Da

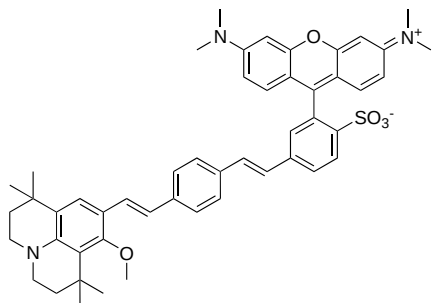
MS(ESI⁺): MW(M+2H)²⁺ = 365 Da

¹H NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 7,95 (1H, d, *J*=8,2 Hz); 7,80 (1H, dd, *J*=8,3; 1,7 Hz); 7,53 – 7,43 (5H, m); 7,30 (5H, m, *J*=15,6 Hz); 7,10 (3H, m); 7,05 (3H, dd, *J*=9,5; 2,4 Hz); 6,89 (2H, d, *J*=2,3 Hz); 3,84 (3H, s); 3,42 (4H, s); 3,24 (12H, s); 1,08 (6H, t, *J*=7,0 Hz)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 160,56; 158,43; 157,36; 157,28; 146,34; 137,90; 133,11; 130,54; 130,03; 128,62; 127,97; 127,60; 127,48; 127,26; 126,62; 126,41; 123,65; 114,36; 114,18; 96,08; 55,92; 40,88; 17,27, 12,50

Irodalom: 49

5.2.22. 2-(6-(Dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3*H*-xantén-9-il)-4-((*E*)-4-((*E*)-2-(8-metoxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*-pirido[3,2,1-*ij*]kinolin-9-il)vinil)stiril)benzolszulfonát



23

Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével és bemértem **21**-et (47 mg; 0,0938 mmol), **14**-et (40 mg; 0,103 mmol), P(*o*-tol)₃-t (5,71 mg; 0,0188 mmol), majd ezeket oldottam vízmentes DMF-ben (2 ml) és TEA-ban (0,6 ml). Végül Pd(OAc)₂-ot (1,9 mg; 0,00844 mmol) adtam hozzá és pár percen keresztül 300 °C-on kevertettem. A reakciót lehűtöttem szobahőmérsékletre és az oldószert vákuumban

távolítottam el. A terméket preparatív HPLC (40–75% MeCN, 0,02% TFA-s víz, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 13% (10 mg), lila szilárd anyag.

Retenciós idő: 5,45 perc (1. módszer)

λ_{max} : 552 nm

Elméleti MW a C₅₀H₅₃N₃O₅S összegképletre számolva: 807,3706Da

MS(ESI⁺): MW(M+2H)²⁺ = 405 Da

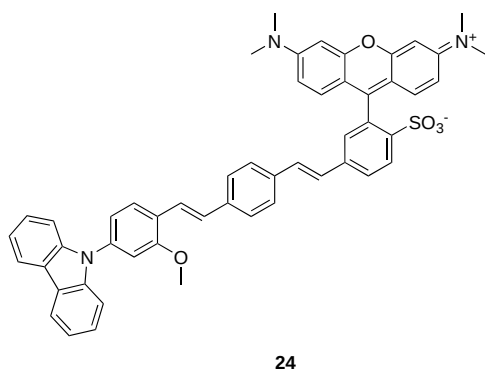
HR-MS: MW(M+H)⁺ = 808,3823 Da; D = 5,44 ppm MW(M+2H)²⁺ = 404,6974 Da; D = 5,44 ppm

¹H NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 7,94 (1H, d, *J*=8,2 Hz); 7,80 (1H, dd, *J*=8,3; 1,7 Hz); 7,51 (4H, s); 7,42 (1H, d, *J*=1,7 Hz); 7,33 (1H, s); 7,30 (1H, d, *J*=16,3 Hz); 7,24 (1H, d, *J*=16,6 Hz); 7,18 (1H, d, *J*=16,4 Hz); 7,10 (2H, d, *J*=9,5 Hz); 7,05 (2H, dd, *J*=9,5; 2,4 Hz); 6,92 (1H, d, *J*=16,2 Hz); 6,89 (2H, d, *J*=2,4 Hz); 3,67 (3H, s); 3,24 (12H, s); 3,10 (2H, t, *J*=5,9 Hz); 3,07 – 3,02 (2H, m); 1,65 (4H, t, *J*=5,8; 5,2 Hz); 1,33 (6H, s); 1,23 (6H, s)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 160,57; 157,36; 157,28; 146,30; 143,20; 138,57; 137,93; 135,35; 133,12; 130,58; 130,02; 128,61; 127,60; 127,47; 127,21; 126,89; 126,59; 126,31; 125,30; 123,75; 123,22; 122,14; 117,87; 114,35; 114,19; 96,07; 62,74; 47,07; 46,61; 40,88; 40,19; 36,95; 32,71; 32,42; 31,88; 30,80

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.23. 4-((E)-4-((E)-4-(9H-Karbazol-9-il)-2-metoxisztil)sztil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xantén-9-il)benzolszulfonát



Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével és bemértem **21**-et (34,1 mg; 0,0679 mmol), **18**-at (30 mg; 0,0747 mmol), P(*o*-tol)₃-t (4,13 mg; 0,0136 mmol), majd ezeket oldottam vízmentes DMF-ben (0,93 ml) és TEA-ban (0,475 ml). Végül Pd(OAc)₂-ot (1,37 mg; 0,00611 mmol) adtam hozzá és 20 órán keresztül 110 °C-on kevertettem. A reakciót lehűtöttem

szobahőmérsékletre és az oldószert vákuumban távolítottam el. A terméket preparatív HPLC (40-75% MeCN, 0,02% TFA-s víz, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 23% (12.6 mg), lila szilárd anyag.

Retenciósi idő: 5,38 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 552 nm

Elméleti MW a C₅₂H₄₃N₃O₅S összegképletre számolva: 821,2923 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 822 Da

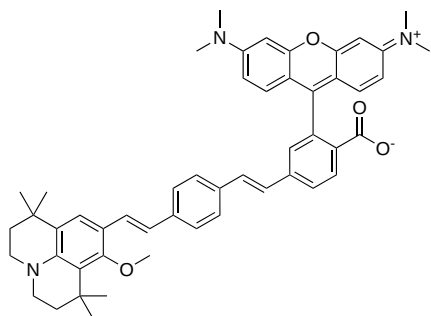
HR-MS: MW(M+H)⁺ = 822,3007 Da; D = 1,34 ppm

¹H NMR (600 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 8,24 (2H, d, *J*=7,8 Hz); 7,97 (1H, d, *J*=8,1 Hz); 7,92 (1H, d, *J*=8,2 Hz); 7,84 (1H, dd, *J*=8,2; 1,7 Hz); 7,62 – 7,60 (2H, m); 7,60 – 7,57 (2H, m); 7,52 (1H, d); 7,49 (2H, d, *J*=8,5 Hz); 7,46 – 7,45 (1H, m); 7,44 (2H, t); 7,37 (1H, s); 7,35 (1H, s); 7,32 – 7,31 (1H, m); 7,28 (2H, t); 7,27 (1H, d, *J*=2,1 Hz); 7,21 (1H, dd, *J*=8,1; 2,0 Hz); 7,12 (2H, d, *J*=9,5 Hz); 7,07 (2H, dd, *J*=9,5; 2,4 Hz); 6,91 (2H, d, *J*=2,4 Hz); 3,91 (3H, s); 3,25 (12H, s)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 160,57; 158,01; 157,37; 157,31; 146,51; 140,47; 137,81; 137,70; 137,57; 136,56; 133,14; 130,44; 130,05; 129,62; 128,66; 128,08; 127,75; 127,56; 127,35; 127,07; 126,77; 125,28; 123,25; 122,84; 120,96; 120,57; 119,09; 114,37; 114,21; 110,41; 110,32; 96,08; 56,45; 40,89

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.24. 2-(6-(Dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3*H*-xantén-9-il)-4-((*E*)-4-((*E*)-2-(8-metoxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*-pirido[3,2,1-*ij*]kinolin-9-il)vinil)stiril)benzoát



25

Egy gömblombikot inertizáltam nitrogén segítségével és bemértem **6**-ot (27,3 mg; 0,0586 mmol), **14**-et (25 mg; 0,0645 mmol), P(*o*-tol)₃-t (3,57 mg; 0,0117 mmol), majd ezeket oldottam vízmentes DMF-ben (0,8 ml) és TEA-ban (0,41 ml). Végül Pd(OAc)₂-ot (1,18 mg; 0,00528 mmol) adtam hozzá és 20 órán keresztül 110 °C-on kevertettem. A reakciót lehűtöttem szobahőmérsékletre és az oldószert

vákuumban távolítottam el. A terméket preparatív HPLC (40-75% MeCN, 0,02% TFA-s víz, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 16,6% (7,5 mg), lila szilárd anyag.

Retenciósi idő: 5,34 perc (1. módszer)

λ_{max} : 552 nm

Elméleti MW a C₅₁H₅₃N₃O₄ összegképletre számolva: 771,4036 Da

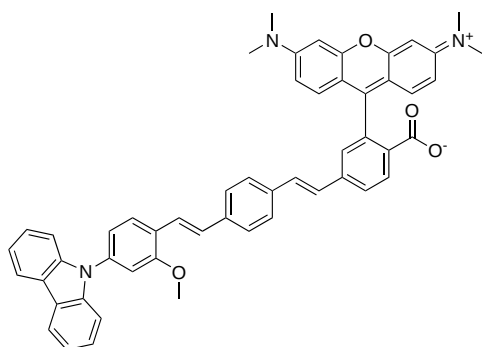
MS(ESI⁺): MW(M+2H)²⁺ = 387 Da

¹H NMR (600 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 8,19 (1H, d, *J*=8,3 Hz); 7,96 (1H, d, *J*=8,3 Hz); 7,68 (1H, s); 7,56 (4H, s); 7,48 (1H, d, *J*=16,4 Hz); 7,39 – 7,31 (2H, m); 7,21 (1H, d, *J*=16,4 Hz); 7,14 – 7,02 (4H, m); 7,01 – 6,91 (3H, m); 3,68 (3H, s); 3,25 (12H, s); 3,11 (2H, t, *J*=5,9 Hz); 3,05 (2H, t, *J*=5,6 Hz); 1,66 (4H, t, *J*=5,8 Hz); 1,34 (6H, s); 1,24 (6H, s)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 157,34; 157,20; 143,28; 139,15; 134,98; 132,78; 127,81; 126,90; 126,67; 125,89; 125,66; 123,63; 123,23; 122,13; 118,24; 117,77; 96,72; 62,78; 47,07; 46,60; 40,94; 40,09; 36,97; 36,90; 32,72; 32,42; 31,86; 30,80; 17,30

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.25. 4-((*E*)-4-((*E*)-4-(9*H*-Karbazol-9-il)-2-metoxisztil)sztil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3*H*-xantén-9-il)benzoát



26

Egy gömblombikot inertizáltam N₂ segítségével és bemértem **6**-ot (31,6 mg; 0,0679 mmol), **18**-at (30 mg; 0,0747 mmol), P(*o*-tol)₃-t (4,13 mg; 0,0136 mmol), majd ezeket oldottam vízmentes DMF-ben (0,92 ml) és TEA-ban (0,47 ml). Végül Pd(OAc)₂-ot (1,37 mg; 0,00611 mmol) adtam hozzá és 20 órán keresztül 110 °C-on kevertettem. A reakciót lehűtöttem

szobahőmérsékletre és az oldószert vákuumban távolítottam el. A terméket preparatív HPLC (40-80% MeCN, 0,02% TFA-s víz, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 74% (40 mg), lila szilárd anyag.

Retenciósi idő: 5,26 perc (1. módszer)

λ_{max} : 552 nm

Elméleti MW a C₅₃H₄₃N₃O₄ összegképletre számolva: 785,3254 Da

MS(ESI⁺): MW(M+H)⁺ = 786 Da

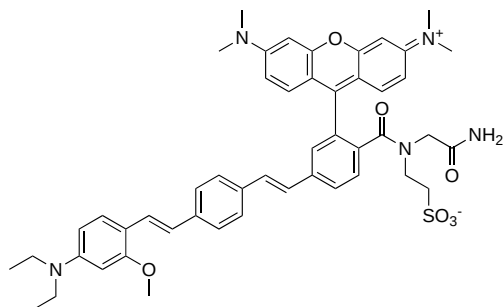
HR-MS: MW(M+H)⁺ = 786,3343 Da; D = 2,16 ppm

¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 8,29 – 8,25 (2H, m); 8,22 (1H, d, J=8,2 Hz); 8,00 (1H, dd, J=8,3; 1,7 Hz); 7,95 (1H, d, J=8,3 Hz); 7,72 (1H, s); 7,65 (4H, s); 7,58 – 7,49 (4H, m); 7,48 – 7,43 (3H, m); 7,38 (1H, d, J=16,6 Hz); 7,32-7,28 (3H, m); 7,24 (1H, dd, J=8,1; 2,1 Hz); 7,14-7,03 (4H, m); 6,95 (2H, s); 3,93 (3H, s); 3,26 (12H, s)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 166,50; 158,26; 157,01; 142,00; 140,45; 138,10; 137,80; 136,20; 132,60; 131,80; 131,16; 129,54; 128,50; 128,14; 127,90; 127,44; 126,80; 126,64; 125,2; 123,25; 123,16; 121,01; 120,62; 119,11; 118,29; 110,43; 110,34; 96,76; 56,48; 40,97

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.26. *N*-(9-(2-((2-Amino-2-oxoetil)(2-szulfoetil)karbamoil)-5-((*E*)-4-((*E*)-4-(diethylamino)-2-metoxistiril)stiril)fenil)-6-(dimetilamino)-3*H*-xantén-3-ildén)-*N*-metilmetánaminium



27

Egy gömblombikot N₂ segítségével inertizáltam, majd bemértem 7-et (40mg; 0,0578 mmol), HATU-t (27,5 mg; 0,0723 mmol), vízmentes DIPEA-t (0,0126 ml) és DMF-et (2 ml). Az elegyet 1 órán át kevertettem, majd hozzáadtam ACES-t (13,2 mg; 0,0723 mmol) és hagytam tovább keveredni 1 éjszakáig. A terméket preparatív HPLC (30-60%

MeCN-0,02% TFA-s víz, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 38% (22 mg), bordó szilárd anyag.

Retenciós idő: 3,71 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 561 nm

Elméleti MW a C₄₉H₅₃N₅O₇S összegképletre számolva: 855,3666 Da

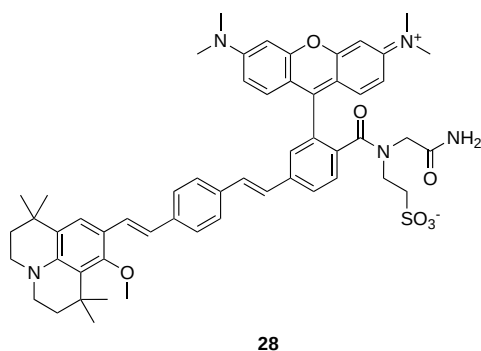
MS(ESI⁺): MW(M+2H)²⁺ = 429 Da

¹H NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 7,95 – 6,75 (20H, m); 6,28 (2H, br); 3,84 (3H, s); 3,65 (2H, m); 3,42 (4H, m); 3,28 (6H, s); 3,26 (6H, s); 3,22 (2H, m); 1,91 – 1,85 (2H, m); 1,09 (6H, t, J=7,0 Hz)

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) 40,94 (OCH₃); 40,16 (SCH₂); az anyag mennyisége nem tette lehetővé minden szénjel azonosítását

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.27. 2-(N-(2-Amino-2-oxoetil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xantén-9-il)-4-((E)-4-((E)-2-(8-metoxi-1,1,7,7-tetrametil-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-pirido[3,2,1-ij]kinolin-9-il)vinil)sztiril)benzamido)etán-1-szulfon



Egy gömblombikot N₂ segítségével inertizáltam, majd bemértem 25-öt (5 mg; 0,00648 mmol), ACES-t (5,9 mg; 0,0324 mmol), vízmentes DIPEA-t (0,00564 ml) és DMF-et (0,5 ml), majd legvégül a COMU-t (13,9 mg; 0,0324 mmol), és hagytam keveredni 1 éjszakáig. A terméket preparatív HPLC (40-75% MeCN-0,02% TFA-s víz, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam.

Termelés: 5% (0,3 mg), bordó szilárd anyag.

Retenciós idő: 5,11 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 560 nm

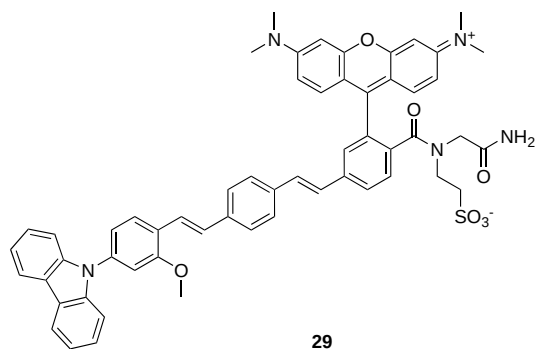
Elméleti MW a C₅₅H₆₁N₅O₇S összegképletre számolva: 935,4292 Da

MS(ESI⁺): MW(M+2H)²⁺ = 468 Da; MW(M+H)⁺ = 936

A keletkezett mennyiség nem volt elegendő az NMR spektrumok felvételére, így azt a méretnövelés után tervezem elvégezni.

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.2.28. 2-(4-((E)-4-((E)-4-(9H-Karbazol-9-il)-2-metoxisztiril)sztiril)-N-(2-amino-2-oxoetil)-2-(6-(dimetilamino)-3-(dimetiliminio)-3H-xanén-9-il)benzamido)etán-1-szulfonát



Egy gömblombikot N₂ segítségével inertizáltam, majd bemértem 26-ot (13 mg; 0,0165 mmol), HATU-t (15,7 mg; 0,0413 mmol), vízmentes DIPEA-t (0,0611 ml) és DMF-et (1 ml). Az elegyet 1 órán át kevertettem, majd hozzáadtam ACES-t (11,3 mg; 0,0619 mmol) és hagytam tovább keveredni 1 éjszakáig. A terméket preparatív HPLC

(30-60% MeCN-0,02% TFA-s víz, lineáris gradiens) segítségével tisztítottam. Termelés: 7% (1,01 mg), bordó szilárd anyag.

Retenciós idő: 5,14 perc (1. módszer)

$\lambda_{\max}$: 560 nm

Elméleti MW a $C_{57}H_{51}N_5O_7S$ összegképletre számolva: 949,3509 Da

MS(ESI⁺): $MW(M+H)^+ = 950$ Da

A keletkezett mennyiség nem volt elegendő az NMR spektrumok felvételére, így azt a méretnövelés után tervezem elvégezni.

Irodalom: irodalomban nem ismert

5.3. Liposzómás tesztelésekhez alkalmazott műszerek és oldatok elkészítésének részletes leírása

5.3.1. Méréshez szükséges segédanyagok elkészítése

HEPES puffer oldat (20 mM): HEPES-t (2859,6 mg; 12 mmol) oldottam vízben (600 ml) és az oldat pH-ját aminoizobutanol segítségével 7-esre állítottam be.

K_2SO_4 -oldatok:

2. táblázat: Az elkészített K_2SO_4 -oldatok adatai

Oldat száma	K_2SO_4 koncentráció	Szacharóz koncentráció	K_2SO_4 bemért tömeg	Szacharóz bemért tömeg	HEPES pufferoldat
1	0,025 mM	750 mM	0,22 mg	12836,5 mg	50 ml
2	2,5 mM	742,5 mM	22 mg	12708 mg	50 ml
3	250 mM	0 mM	2178,5 mg	0 mg	50 ml

Liposzóma elkészítése: DOPE-t (3,095 mg; 0,00416 mmol), DOPC-t (13,08 mg; 0,01664 mmol) és koleszterint (2,01 mg; 0,0052 mmol) a 2,5 mM koncentrációjú K_2SO_4 -oldatban (2 ml) oldottam. Az oldatot felhasználva az Avanti Polar Lipid extruder segítségével 50 °C-on állítottam elő liposzómákat. A lipid extruder működtetéséhez az Avanti Polar Lipid szűrőtámogatót (10 mm) és polikarbonát membránt (0,1 μ m; 19 mm) használtam, amelyen hétszer nyomtam át a lipid oldatot.

A mérések során felhasznált további oldatok (feszültségszenzorok, BME44) koncentrációja 2 mM, valamint minden esetben spektroszkópiához szükséges tisztaságú DMSO oldószerrel készültek.

A fluoreszcencia méréséhez a Shimadzu RF-6000 spektrofluorifotométert és a Hellma Analytics nagy pontosságú celláját (10x10 mm) alkalmaztam küvettaként. Minden esetben a műszer 600 nm min⁻¹ szkennelési sebességgel, 3 nm spektrális szélességgel és alacsony érzékenységi beállítással működött. A mért értékeket 1 nm-enként rögzítettem. A gerjesztési és emissziós maximumot, valamint szkennelési tartományt a mért anyagtól függően választottam.

3. táblázat: A mérésekhez alkalmazott beállítások egyes anyagok esetében

Minta neve/száma	Emissziós spektrum mérése		Gerjesztési spektrum mérése	
	Gerjesztés	Mért tartomány	Emisszió	Mért tartomány
di-4-ANNEPS	465 nm	450-800 nm	578 nm	300-600 nm
22	553 nm	560-800 nm	580 nm	300-575 nm
23	553 nm	560-800 nm	578 nm	300-600 nm
25	553 nm	560-800 nm	578 nm	300-600 nm
27	560 nm	560-800 nm	589 nm	300-600 nm

Fluoreszcenciaméréshez használt mennyiségek:

4. táblázat: A mérésekhez alkalmazott oldatokból bemért mennyiségek

K ₂ SO ₄ -oldat	Festékoldat	Liposzóma	Fázistranszfer katalizátor
1966 µl	1 µl	31 µl	2 µl

5.4. A HEK sejtes tesztelés részletes leírása

23-ból egy 500 mM koncentrációjú DMSO oldatot készítettek, melynek ezerszeres hígítása került az extracelluláris médiumba, ahol az oldat összetétele: 140 mM Na-glükonát, 5 mM K-glükonát, 3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM glükóz, 10 mM HEPES, valamint az oldat pH-ját 7,4-re állították be NaOH segítségével. Ebben történt a HEK293 sejtvonalból származó sejtek inkubálása 37 °C-on 20 percen keresztül. Ezután a mosás a festéket nem tartalmazó azonos oldattal történt.

Az alkalmazott módszer a teljes testes „patch-clamp” módszer volt, melyhez a Multiclamp 700B, Digidata 1440 molekuláris eszközöket használták. Az alkalmazott pipetta 3-5 µm átmérőjű kapillárisal rendelkezett, a benne található oldat összetétele 135 mM K-glükonát, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM glükóz, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA volt, valamint az oldat pH-ját 7,4-re állították be KOH segítségével.

A mérésekhez a 3D AO lézeres pásztázó mikroszkópot (ATLAS, Femtonics), a Chameleon Discovery 660-1320 nm lézert alkalmazták. Az impulzus hosszát 100 fs-mal az objektív alá állították be az ATLAS mikroszkóp motoros négy prizma szekvenciájának segítségével (4DBCUC egység, Femtonics). Az alkalmazott lencse a 16× vízbe merülő objektív volt 0,8 NA és 3 mm WD-vel (Nikon CFI LWD Plan Fluorite Objective, N16XLWD-PF). Detektorként fotoelektron-sokszorozót használtak, a piros detektor segítségével az 570-640 nm tartományt, a zöld detektor segítségével pedig a 490-550 nm hullámhossz tartományt detektáltak. Köztük egy dikroikus tükör helyezkedett el, melynek kimenetein kromatikus szűrők (ET605/70m, ET520/60m-2p) biztosították a megfelelő tartományú fény átengedését.

5.5. Kvantumkémiai számítások részletes leírása

A számítások elvégzéséhez a Gaussian 16W és a GaussView 6.1 elnevezésű programokat alkalmaztam. Minden esetben sűrűség funkcionális elmélet (DFT) szerinti számolást végeztem alapértelmezett spinek segítségével. Az alkalmazott bázis az oldószerek vizsgálata esetén a B3LYP/ 6-311++G(d,p), míg a további számítások esetében a B3LYP/ 6-311+G(d,p) volt. Az általános beállításoknál megtiltottam a molekula szimmetrizálását (NoSymm), a „Write Cartesians”, „Write PBD Data” opciókat, míg az előzetes becsléshez („initial guess”) a „Mix HOMO and LUMO orbitals” lehetőséget választottam. Az oldószer esetében integrál egyenlet szabályozású polarizálható kontinuum modellt (IEFPCM) használtam. Először többféle oldószert teszteltem (5.5. fejezet), majd a továbbiakban vizet (relatív permittivitás: $\epsilon = 78,2$) alkalmaztam oldószerként a modellben. A különböző térerősségek beállítását az „additional keywords” opciónál „field = $z \pm n$ ” paranccsal adtam meg, mely esetében a „ $\pm$ ” a dipólus irányára, az „n” pedig a dipólusmomentum nagyságára vonatkozik atomi egységben (a.u.: Hartree atomi egység, $1 \text{ a.u.} = 8,478 \times 10^{-30} \text{ C m}$) megadva.

Négy különböző típusú számítást végeztem, amelyekhez az alapbeállításokon az alábbiakat módosítottam:

1. Alapállapotú geometriai optimalizálás: optimalizálás és frekvencia számítás alapállapotban.
2. Gerjesztett állapotú frekvencia számítás: az 1. eredményéből kiindulva csak energia és frekvencia értékek számítása, időfüggő önkonzisztens tér (TD-SCF) metódussal 6 állapotra megoldva („nstates = 6” parancs).

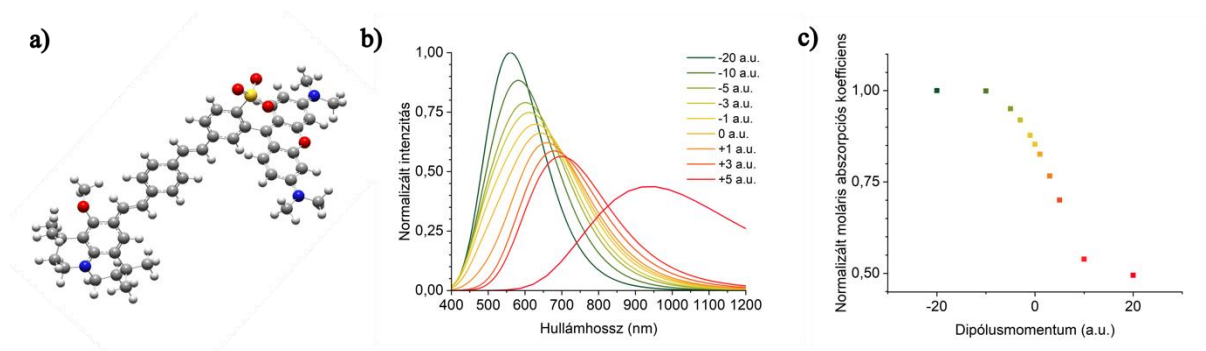
3. Gerjesztett állapotú optimalizáció: az 1. eredményéből kiindulva optimalizáció és frekvencia számítás, TD-SCF módszerrel. Az előző lépés eredményét kiértékelve kapott legnagyobb oszcillátorerősségű (következtetésképp valószínűségű) elektronátmenet számát jelöltem, hogy arra az átmenetre irányuljanak a számítások („root = n ” parancs).
4. Alapállapotú frekvencia számítás: a 3. eredményéből kiindulva alapállapotú frekvencia számítás elvégzése.

Az optimalizációk esetében minden esetben ellenőriztem, hogy a kapott geometria esetében nincs negatív frekvenciaérték a számolt frekvenciák között.

6. Összefoglalás

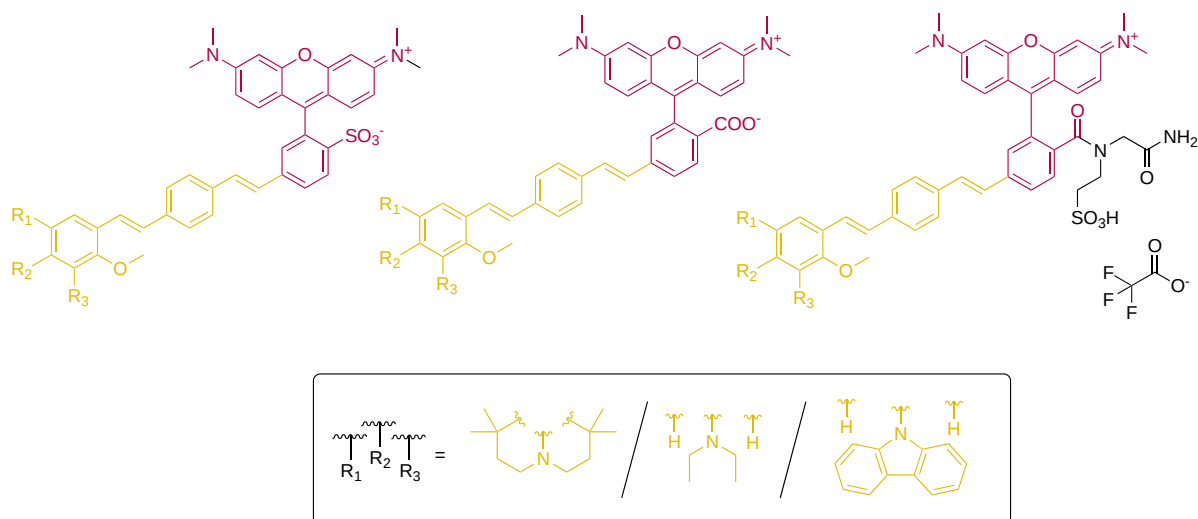
A membránpotenciál változásainak követése elengedhetetlen a neurobiológiai folyamatink jobb megismeréseit célzó kutatások esetében. Azonban erre a lehetőségek száma még ma is korlátozott, ezért munkám során rodaminalapú, fotoindukált elektrontranszfer (PeT) elvén működő feszültség-szenzor molekulák vizsgálatát és fejlesztését tűztem ki célul.

Az előállítani kívánt molekulák közül három fotokémiai tulajdonságait kvantumkémiai számítások segítségével vizsgáltam. Optimalizáltam a számításokhoz alkalmazott körülményeket, vizsgáltam a dipólus elhelyezkedésének hatását a számított eredményekre. Különböző dipólusmomentumok segítségével feltérképeztem a molekulák elektrokromicitását (42. ábra).



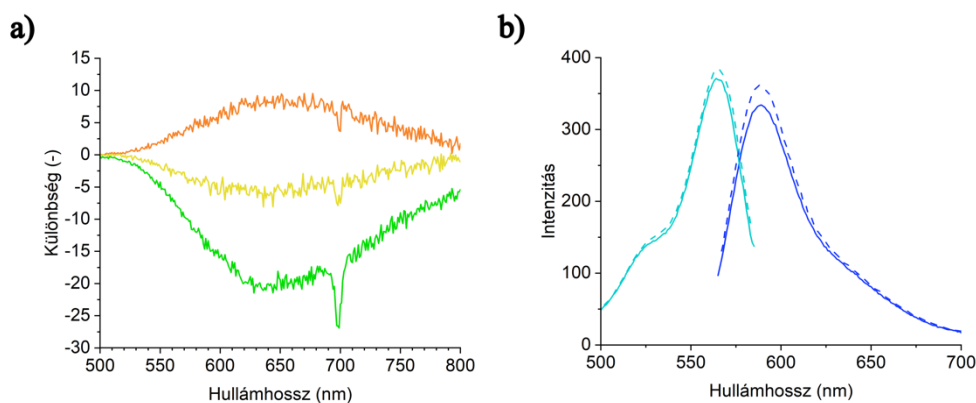
42. ábra: 22 a) modellezése a Gaussian nevű programban; b) emissziós spektrumának és c) fluoreszencia intenzitásának változása a dipólusmomentum függvényében

A kutatás során számos szintetikus sikert értem el. A festékek jobb megismerése és vizsgálhatósága érdekében sikeresen előállítottam két irodalomban ismert festéket. Hét új feszültség-szenzorok (43. ábra) előállítását végeztem el kereskedelmi forgalomban kapható aromás aldehidekből Wittig- és Heck-reakciók segítségével. Megvalósítottam szén–nitrogén-kötés kialakítását Ullmann-reakció használatával, valamint vizsgáltam egy szulfonsav-csoportot tartalmazó rodaminváz előállítását számos körülmény között. Feltérképeztem karbonsavak HATU reagens alkalmazása mellett végzett kapcsolások során keletkező melléktermékeket.



43. ábra: A szintetikus munka során előállított, eltérően szubsztituált anilint tartalmazó feszültség-szenzor festékek szerkezeti képlete

A feszültség-szenzorok könnyebb fejleszthetősége érdekében vizsgáltam egy fluorimetriás tesztelési módszert, mely során létrehoztam egy rendszert, amely liposzómás környezetben, koncentrációgradiens és fázistranszfer katalizátor segítségével imitálja a vizsgálni kívánt membránpotenciált. Ennek működőképességét az irodalomban ismert di-4-ANNEPS molekula fluorimetriás vizsgálata során támasztottam alá (**44. ábra**). Ezenfelül a módszer segítségével igazoltam, hogy a három legígéretesebb általam előállított festék képes lokalizálódni a plazmamembránban (**44. ábra**). Az egyik általam előállított festék feszültségérzékenységét biológus kollégák kétfoton mikroszkópiás mérésben igazolták.



44. ábra: a) A di-4-ANNEPS fluoreszcencia intenzitásának különbsége ionofór hozzáadása előtt és után különböző külső K^+ koncentrációk esetén; b) 27 fluoreszcencia intenzitás növekedése liposzóma jelenlétekor

Összességében két irodalomban ismert és hét új feszültség-szenzort állítottam elő, melyek közül a legígéretesebbek membránban való lokalizációját igazoltam. Megvalósítottam

kvantumkémiai számításokat, melyek alapján jobban megérthetjük a szenzorok működését, valamint kidolgoztam és validáltam egy tesztelési módszer alapjait, mely a jövőben kiválthatja a bonyolult, műszerigényes fluoreszcencia mikroszkópiás mérések használatát.

7. Irodalomjegyzék

1. Héder, M. *et al.* The Past, Present and Future of the ELKH Cloud. *Információs Társadalom* **22**, 128 (2022).
2. Woodford, C. R. *et al.* Improved PeT molecules for optically sensing voltage in neurons. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 1817–1824 (2015).
3. Deal, P. E., Kulkarni, R. U., Al-Abdullatif, S. H. & Miller, E. W. Isomerically Pure Tetramethylrhodamine Voltage Reporters. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 9085–9088 (2016).
4. Miller, E. W. Small molecule fluorescent voltage indicators for studying membrane potential. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **33**, 74–80 (2016).
5. Woodford, C. R. *et al.* Improved PeT Molecules for Optically Sensing Voltage in Neurons. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 1817–1824 (2015).
6. Salzberg, B. M., Davila, H. V & Cohen, L. B. Optical Recording of Impulses in Individual Neurones of an Invertebrate Central Nervous System. *Nature* **246**, 508–509 (1973).
7. Johnson, L. V, Walsh, M. L. & Chen, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 990–994 (1980).
8. Grinvald, A., Fine, A., Farber, I. C. & Hildesheim, R. Fluorescence monitoring of electrical responses from small neurons and their processes. *Biophys. J.* **42**, 195–198 (1983).
9. Fluhler, E., Burnham, V. G. & Loew, L. M. Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochem. J.* **24**, 5749–5755 (1985).
10. Fromherz, P., Hübener, G., Kuhn, B. & Hinner, M. J. ANNINE-6plus, a voltage-sensitive dye with good solubility, strong membrane binding and high sensitivity. *Eur. Biophys. J.* **37**, 509–514 (2008).
11. Davila, H. V, Salzberg, B. M., COHEN, L. B. & WAGGONER, A. S. A Large Change in Axon Fluorescence that Provides a Promising Method for Measuring Membrane Potential. *Nat. New Biol.* **241**, 159–160 (1973).
12. St-Pierre, F. *et al.* High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nat. Neurosci.* **17**, 884–889 (2014).
13. Castro-Alamancos, M. A. Cortical Up and Activated States: Implications for Sensory Information Processing. *Neuroscientist* **15**, 625–634 (2009).
14. Magee, J. C. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**,

- 181–190 (2000).
15. Zecevic, D. *et al.* Imaging Nervous System Activity with Voltage-Sensitive Dyes. *Curr. Protoc. Neurosci.* **23**, 6.17.1-6.17.29 (2003).
 16. Beija, M., Afonso, C. A. M. & Martinho, J. M. G. Synthesis and applications of rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2410–2433 (2009).
 17. Sjöback, R., Nygren, J. & Kubista, M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **51**, L7–L21 (1995).
 18. Bar, N. & Chowdhury, P. A Brief Review on Advances in Rhodamine B Based Chromic Materials and Their Prospects. *ACS Appl. Electron. Mater.* **4**, 3749–3771 (2022).
 19. Rajasekar, M. Recent development in fluorescein derivatives. *J. Mol. Struct.* **1224**, 129085 (2021).
 20. Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450 (1985).
 21. Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S. & Miyawaki, A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 3197–3202 (2001).
 22. Mank, M. *et al.* A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nat. Methods* **5**, 805–811 (2008).
 23. Miller, E. W. *et al.* Optically monitoring voltage in neurons by photo-induced electron transfer through molecular wires. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 2114–2119 (2012).
 24. Huang, Y.-L., Walker, A. S. & Miller, E. W. A Photostable Silicon Rhodamine Platform for Optical Voltage Sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 10767–10776 (2015).
 25. Rose, A. S. *et al.* NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinform.* **34**, 3755–3758 (2018).
 26. Deal, P. E. *et al.* Covalently Tethered Rhodamine Voltage Reporters for High Speed Functional Imaging in Brain Tissue. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 614–622 (2020).
 27. Hassner, A., Birnbaum, D. & Loew, L. M. Charge-shift probes of membrane potential. Synthesis. *J. Org. Chem.* **49**, 2546–2551 (1984).
 28. Zhou, W.-L., Yan, P., Wuskell, J. P., Loew, L. M. & Antic, S. D. Intracellular long-wavelength voltage-sensitive dyes for studying the dynamics of action potentials in axons and thin dendrites. *J. Neurosci. Methods* **164**, 225–239 (2007).
 29. Kuhn, B. & Fromherz, P. Anellated hemicyanine dyes in a neuron membrane: Molecular Stark effect and optical voltage recording. *J. Phys. Chem. B* **107**, 7903–7913

- (2003).
30. Lebeuf, R., Férézou, I., Rossier, J., Arseniyadis, S. & Cossy, J. Straightforward Synthesis of the Near-Infrared Fluorescent Voltage-Sensitive Dye RH1691 and Analogues Thereof. *Org. Lett.* **11**, 4822–4825 (2009).
 31. Yan, P. *et al.* Palette of fluorinated voltage-sensitive hemicyanine dyes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 20443–20448 (2012).
 32. Davis, W. B., Svec, W. A., Ratner, M. A. & Wasielewski, M. R. Molecular-wire behaviour in *p*-phenylenevinylene oligomers. *Nature* **396**, 60–63 (1998).
 33. de la Torre, G., Giacalone, F., Segura, J. L., Martín, N. & Guldi, D. M. Electronic Communication through π -Conjugated Wires in Covalently Linked Porphyrin/C60 Ensembles. *Chem. Eur. J.* **11**, 1267–1280 (2005).
 34. Hübener, G., Lambacher, A. & Fromherz, P. Anellated Hemicyanine Dyes with Large Symmetrical Solvatochromism of Absorption and Fluorescence. *J. Phys. Chem. B* **107**, 7896–7902 (2003).
 35. Garner, L. E. *et al.* Modification of the Optoelectronic Properties of Membranes via Insertion of Amphiphilic Phenylenevinylene Oligoelectrolytes. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 10042–10052 (2010).
 36. Rehm, D. & Weller, A. Kinetics of Fluorescence Quenching by Electron and H-Atom Transfer. *Isr. J. Chem.* **8**, 259–271 (1970).
 37. Li, L. Fluorescence Probes for Membrane Potentials Based on Mesoscopic Electron Transfer. *Nano Lett.* **7**, 2981–2986 (2007).
 38. Loew, L. M., Bonneville, G. W. & Surow, J. Charge shift optical probes of membrane potential. Theory. *Biochem. J.* **17**, 4065–4071 (1978).
 39. Loew, L. M. Design and Use of Organic Voltage Sensitive Dyes. in *Membrane Potential Imaging in the Nervous System and Heart. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 859 (eds. Canepari, M., Zecevic, D. & Bernus, O.) 27–53 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-17641-3_2.
 40. Kulkarni, R. U. *et al.* A Rationally Designed, General Strategy for Membrane Orientation of Photoinduced Electron Transfer-Based Voltage-Sensitive Dyes. *ACS Chem. Biol.* **12**, 407–413 (2017).
 41. Kulkarni, R. U. *et al.* Voltage-sensitive rhodol with enhanced two-photon brightness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, 2813–2818 (2017).
 42. Boggess, S. C., Gandhi, S. S., Benlian, B. R. & Miller, E. W. Vinyl-Fluorene Molecular Wires for Voltage Imaging with Enhanced Sensitivity and Reduced

- Phototoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 11903–11907 (2021).
43. Boggess, S. C. *et al.* New Molecular Scaffolds for Fluorescent Voltage Indicators. *ACS Chem. Biol.* **14**, 390–396 (2019).
 44. Moshtagh-Khorasani, M., Miller, E. W. & Torre, V. The spontaneous electrical activity of neurons in leech ganglia. *Physiol. Rep.* **1**, (2013).
 45. Nagel, G. *et al.* Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13940–13945 (2003).
 46. Zhang, F. *et al.* The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools. *Cell* **147**, 1446–1457 (2011).
 47. Weissleder, R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* **19**, 316–317 (2001).
 48. Koide, Y., Urano, Y., Hanaoka, K., Terai, T. & Nagano, T. Evolution of Group 14 Rhodamines as Platforms for Near-Infrared Fluorescence Probes Utilizing Photoinduced Electron Transfer. *ACS Chem. Biol.* **6**, 600–608 (2011).
 49. Kulkarni, R. U. *et al.* In Vivo Two-Photon Voltage Imaging with Sulfonated Rhodamine Dyes. *ACS Cent. Sci.* **4**, 1371–1378 (2018).
 50. Weissleder, R. & Ntziachristos, V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* **9**, 123–128 (2003).
 51. Friebe, M., Helfmann, J., Netz, U. J. & Meinke, M. C. Influence of oxygen saturation on the optical scattering properties of human red blood cells in the spectral range 250 to 2000 nm. *J. Biomed. Opt.* **14**, 34001 (2009).
 52. Hilderbrand, S. A. & Weissleder, R. Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 71–79 (2010).
 53. Gonzalez, M. A. *et al.* Voltage Imaging with a NIR-Absorbing Phosphine Oxide Rhodamine Voltage Reporter. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 2304–2314 (2021).
 54. Raliski, B. K., Mun, D. M. & Miller, E. W. Sulfone Rhodamines for Voltage Imaging. *Asian J. Chem.* **17**, (2022).
 55. Detty, M. R., Gibson, S. L. & Wagner, S. J. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **47**, 3897–3915 (2004).
 56. Helmchen, F. & Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* **2**, 932–940 (2005).
 57. Zipfel, W. R., Williams, R. M. & Webb, W. W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1369–1377 (2003).

58. Bort, G., Gallavardin, T., Ogden, D. & Dalko, P. I. From One-Photon to Two-Photon Probes: “Caged” Compounds, Actuators, and Photoswitches. *Angew. Chem.* **52**, 4526–4537 (2013).
59. Siegel, M. S. & Isacoff, E. Y. A Genetically Encoded Optical Probe of Membrane Voltage. *Neuron* **19**, 735–741 (1997).
60. Baker, B. J. *et al.* Three fluorescent protein voltage sensors exhibit low plasma membrane expression in mammalian cells. *J. Neurosci. Methods* **161**, 32–38 (2007).
61. Kralj, J. M., Douglass, A. D., Hochbaum, D. R., MacLaurin, D. & Cohen, A. E. Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nat. Methods* **9**, 90–95 (2012).
62. Hochbaum, D. R. *et al.* All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nat. Methods* **11**, 825–833 (2014).
63. Flytzanis, N. C. *et al.* Archaeorhodopsin variants with enhanced voltage-sensitive fluorescence in mammalian and *Caenorhabditis elegans* neurons. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
64. Piatkevich, K. D. *et al.* A robotic multidimensional directed evolution approach applied to fluorescent voltage reporters article. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 352–360 (2018).
65. Zou, P. *et al.* Bright and fast multicoloured voltage reporters via electrochromic FRET. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
66. Gong, Y., Wagner, M. J., Li, J. Z. & Schnitzer, M. J. Imaging neural spiking in brain tissue using FRET-opsin protein voltage sensors. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
67. Kannan, M. *et al.* Fast, in vivo voltage imaging using a red fluorescent indicator. *Nat. Methods* **15**, 1108–1116 (2018).
68. Liu, Z. *et al.* Sustained deep-tissue voltage recording using a fast indicator evolved for two-photon microscopy. *Cell* **185**, 3408–3425.e29 (2022).
69. Jin, L. *et al.* Single Action Potentials and Subthreshold Electrical Events Imaged in Neurons with a Fluorescent Protein Voltage Probe. *Neuron* **75**, 779–785 (2012).
70. Gong, Y., Li, J. Z. & Schnitzer, M. J. Enhanced Archaeorhodopsin Fluorescent Protein Voltage Indicators. *PLoS One* **8**, e66959 (2013).
71. Maclaurin, D., Venkatachalam, V., Lee, H. & Cohen, A. E. Mechanism of voltage-sensitive fluorescence in a microbial rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 5939–5944 (2013).
72. Deo, C. *et al.* The HaloTag as a general scaffold for far-red tunable chemigenetic indicators. *Nat. Chem. Biol.* **17**, 718–723 (2021).

73. Abdelfattah, A. S. *et al.* Bright and photostable chemigenetic indicators for extended in vivo voltage imaging. *Science* **365**, 699–704 (2019).
74. Kralj, J. M., Hochbaum, D. R., Douglass, A. D. & Cohen, A. E. Electrical Spiking in *Escherichia coli* Probed with a Fluorescent Voltage-Indicating Protein. *Science* **333**, 345–348 (2011).
75. Hochbaum, D. R. *et al.* All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. *Nat. Methods* **11**, 825–833 (2014).
76. Gong, Y. *et al.* High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor. *Science* **350**, 1361–1366 (2015).
77. Grimm, J. B. *et al.* A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat. Methods* **12**, 244–250 (2015).
78. Los, G. V. *et al.* HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem. Biol.* **3**, 373–382 (2008).
79. Liu, S. *et al.* A far-red hybrid voltage indicator enabled by bioorthogonal engineering of rhodopsin on live neurons. *Nat. Chem.* **13**, 472–479 (2021).
80. Grenier, V., Daws, B. R., Liu, P. & Miller, E. W. Spying on Neuronal Membrane Potential with Genetically Targetable Voltage Indicators. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 1349–1358 (2019).
81. Tsemperouli, M. & Sugihara, K. Characterization of di-4-ANEPPS with nano-black lipid membranes. *Nanoscale* **10**, 1090–1098 (2018).
82. Montana, V., Farkas, D. L. & Loew, L. M. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential. *Biochem. J.* **28**, 4536–4539 (1989).
83. McCann, J. T. *et al.* Flipping the Switch: Reverse-Demand Voltage-Sensitive Fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 13050–13054 (2022).
84. Zhang, X. *et al.* Effect of the Electron Donor/Acceptor Orientation on the Fluorescence Transduction Efficiency of the d-PET Effect of Carbazole-Based Fluorescent Boronic Acid Sensors. *J. Org. Chem.* **75**, 2578–2588 (2010).
85. Zhang, X. *et al.* Rational design of d-PeT phenylethynylated-carbazole monoboronic acid fluorescent sensors for the selective detection of alpha-hydroxyl carboxylic acids and monosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **131** **47**, 17452–17463 (2009).
86. Nho, S. *et al.* Carbazole and rhodanine based donor molecule with improved processability for high performance organic photovoltaics. *Dyes Pigm.* **151**, 272–278 (2018).
87. Matson, M., Carlsson, N., Beke-Somfai, T. & Nordén, B. Spectral Properties and

- Orientation of Voltage-Sensitive Dyes in Lipid Membranes. *Langmuir* **28**, 10808–10817 (2012).
88. Megha, Kumar, V., Kaur, P. & Singh, K. Julolidine based red emitting ESIPT/AIE active material showing luminescence beyond excimer emission: An “on-off” emission response to Cu^{2+} . *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **290**, 122239 (2023).
89. Chou, P.-T. *et al.* Solvent-Polarity Tuning Excited-State Charge Coupled Proton-Transfer Reaction in *p*-*N,N*-Ditolylaminosalicylaldehydes. *J. Phys. Chem. A* **108**, 6487–6498 (2004).
90. Levchenko, K. S. *et al.* Synthesis of unsymmetrical 4-oxo-2-vinyl-4H-chromene-3-carbonitrile dyes via Knoevenagel reaction. *Tetrahedron Lett.* **59**, 2788–2792 (2018).
91. Bhagwat, A. A. & Sekar, N. Fluorescent 7-Substituted Coumarin Dyes: Solvatochromism and NLO Studies. *J. Fluoresc.* **29**, 121–135 (2019).