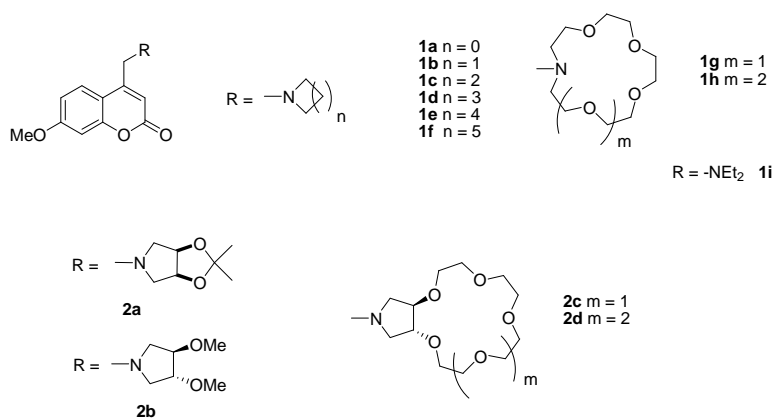


## ZÁRÓJELENTÉS A 048739-ES SZÁMÚ, MOLEKULÁRIS SENZOROK VIZSGÁLATA ÉS TERVEZÉSE CÍMŰ PÁLYÁZATHOZ

### 1. Metodikai fejlesztés

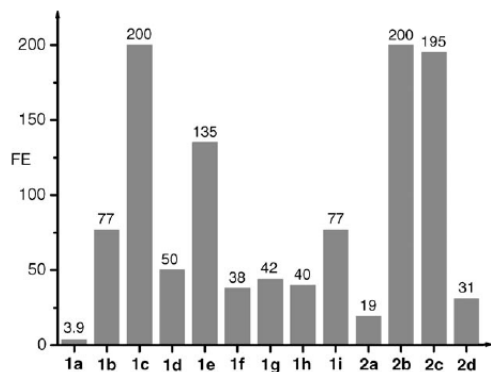
Munkánknak ezen része a jelátviteli folyamat jobb megértését, illetve ebből kifolyólag a szenzorok érzékenységének növelését célozta meg. Előállítottunk olyan N-metilén-kumarin szenzorokat, amelyekben a fluoreszcencia letöréséért felelős nitrogénatom különböző tagszámú gyűrűk részeként szerepelt. A protonálás hatására bekövetkező fluoreszcencia serkentések vizsgálata során arra az érdekes felismerésre jutottunk, hogy a PET folyamat hatékonysága jelentősen függ a nitrogénatomot tartalmazó gyűrű szerkezetétől. Ugyancsak vizsgáltuk a fluoreszcencia változását nyílt láncú, illetve koronaéter-származékok esetében is. Az eredmények rávilágítottak arra, hogy a serkentés mértéke akkor a legnagyobb, ha a kérdéses nitrogénatom egy öttagú (pirrolidin) gyűrű részeként szerepelt. Ezt követően vizsgáltuk, hogy a pirrolidin konformációs szabadsági fokainak változásai vajon hogyan befolyásolják a jelátviteli folyamat hatékonyságát. A pirrolidingyűrű mozgékonyosságának korlátozását egy acetonid egység bevitelével oldottuk meg. A protonálás hatására bekövetkező fluoreszcencia növekedés mértéke ebben az esetben a tízed részére csökkent, azaz a jelátviteli folyamat hatékonysága nagymértékben függ a pirrolidingyűrű konformációs szabadságától. Dimetoxi-pirrolidint tartalmazó származékkal elvégzett kísérlet során igazoltuk, hogy a csökkent jelátvivő képesség nem a pirrolidinhez kapcsolt szubsztituensek hatására következett be. A fenti eredmények vezettek olyan kumarilmetil-pirrolidin szenzorok tervezéséhez és előállításához, ahol a pirrolidin egységhez receptorként funkcionáló 15-korona-5, illetve 18-korona-6 egységeket kapcsolunk (1. Ábra).



1. Ábra. Vizsgált PET szenzorok

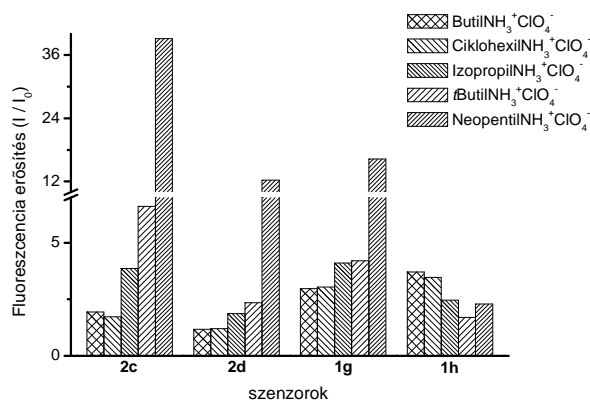
Ezektől a szenzoroktól olyan működési mechanizmust reméltünk, amelynek során a koronaéterben a vendégmolekula bekötése által előidézett konformációs változások átadódnak a pirrolidingyűrűre, megváltoztatva ezzel annak a fluoreszcenciát letörő képességét, így előidézve a fluoreszcencia intenzitásának növekedését. Elsőként vizsgáltuk a két új szenzornak a protonálódás hatására bekövetkező fluoreszcencia serkentését. Megállapítottuk, hogy míg a kisebb méretű receptort tartalmazó vegyület esetében a jelátvivő képesség nem változott a korábban vizsgált, pirrolidint tartalmazó szenzor esetében tapasztaltnál képest, a nagyobb receptort hordozó jelzőmolekula esetében annak egyötöd részére csökkent (2. Ábra). Ez arra engedett következtetni, hogy a két, eltérő méretű koronaéter különböző térszerkezete következtében másképpen torzítja a pirrolidingyűrűt. Megvizsgáltuk a jelátadás hatékonyságát a két újfajta szenzor esetében, különböző térigényű ammóniumsók, mint vendégmolekulák jelenlétében. A feltételezett mechanizmusnak megfelelően azt reméltük, hogy a nagyobb

méretű ammóniumsók nagyobb mértékű torzulásokat idéznek elő mind a koronaéterben, mind a pirrolidin egységben. Megállapítottuk, hogy a két szenzor hasonlóan viselkedik az ammóniumsók jelenlétében, azzal a kivétellel, hogy a jobb jelzőképességgel rendelkező, kisebb receptort tartalmazó szenzor esetében sokkal nagyobb intenzitásváltozásokat tapasztaltunk.



2. Ábra. A vizsgált szenzorok protonálódásakor megfigyelhető fluoreszcencia-serkentések

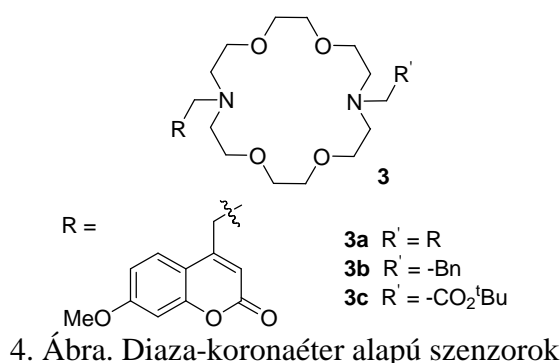
Várakozásainknak megfelelően az ammóniumsók növekvő térigényével nőtt a megfigyelhető fluoreszcencia-serkentések mértéke. A kísérleteket elvégeztük hagyományos szerkezetű, 18-as és 15-ös méretű aza-koronaéter szenzorokkal is. Az eredmények azt mutatták, hogy a kisebb méretű receptort tartalmazó azakorona szenzor esetében az ammóniumsók méretével nőtt a serkentés mértéke. Ezzel szemben az aza-18-korona-6 éter származéknál nem a sók mérete, hanem azok H-híd donor képessége (savassága) a meghatározó faktor (3. Ábra).



3. Ábra. A szenzorok fluoreszcencia-serkentése ammóniumsók jelenlétében

A vizsgálatokból arra következtettünk, hogy az elfogadott elmélettel szemben, amely szerint a vendégmolekuláknak a nitrogénatomhoz való direkt koordinációjának következtében változik a fluoreszcencia intenzitása, egy másik mechanizmus is felelős lehet a fluoreszcencia növekedéséért. Ez a másik mechanizmus a konformációs változások következménye. Valószínűsítjük, hogy a két mechanizmus együttesen felelős a tapasztalható fluoreszcencia serkentésért, a szenzor típusától függően különböző mértékben hozzájárulva ahhoz. Az előállított két újfajta szenzor esetében pl. a közvetlen koordinációból adódó hatások kizárhatók, itt tisztán a konformációs hatások érvényesülnek. A hagyományos szerkezetű, kisebb receptorméretű azakorona szenzornál a két mechanizmus együttesen fejt ki hatását, a konformációs mechanizmus túlsúlyával. A nagyobb receptorméretű azakorona származék esetében a koordinációs hatás érvényesül nagyobb mértékben.

A konformációs dinamika szerepének vizsgálatát kiegészítettük NMR spektroszkópai mérésekkel is. A vizsgált szenzorok sorát tovább bővítettük diaza-koronaéter származékokkal is (4. ábra).



- Az NMR spektroszkópai vizsgálatok négy fontos tényre engedtek következtetni.
1. A vizsgált komplexek minden esetben 1:1 szöchiometriájú komplexeket képeznek, amint ezt a Jobb-féle módszer eredményei mutatják.
  2. Az összehasonlításként szereplő monoaza-koronaéter, **1h** származék minden esetben 2-3 nagyságrenddel stabilabb komplexeket képez a vizsgált ammóniumsókkal (nButil-, neopentil-ammónium perklorát).
  3. A komplex stabilitási állandók egyenesen arányosak az ammóniumsók hidrogénhíd-donor tulajdonságával.
  4. A **2c** és **3a** összehasonlításában a kémiai eltolódás-változás (Deltadelta) minden esetben nagyobb mértékű volt a **1h** komplexeknél.

	<b>1h</b>		<b>2c</b>		<b>3a</b>	
	logK	$\Delta\delta$ (ppm)	logK	$\Delta\delta$ (ppm)	logK	$\Delta\delta$ (ppm)
<b>Butil-NH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	6,00	0,052	3,30	0,077	3,53	0,112
<b>Neopentil-NH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	5,23	0,061	3,00	0,116	2,84	0,228

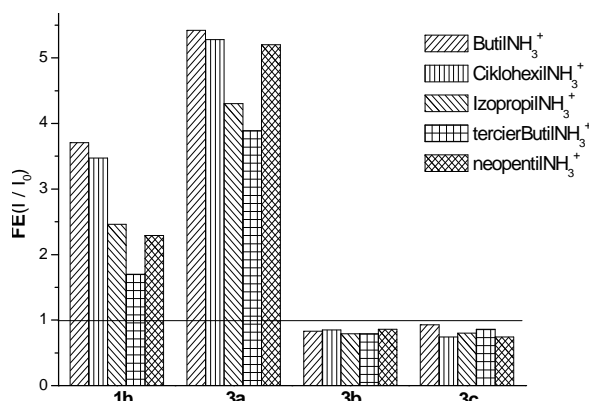
1. Táblázat. Komplex stabilitási állandók és  $\Delta\delta$  értékek vendégmolekulák jelenlétében

Az eredmények alátámasztották korábbi eredményeinket amennyiben a konformációváltozásra érzékeny rendszerekben nagyobb mértékű torzulásokat figyelhettünk meg a komplexálódás során. A torzulás mértéke egyenesen arányos a vendégmolekula méretével. A vizsgált diaza-koronaszármazékok esetében tanulmányoztuk a fluoreszcencia-serkentéseket is vendégmolekulák jelenlétében. A **3a** szenzornál vizsgáltuk először a fluorofórok intra-, és intermolekuláris dimerizációjának lehetőségét (excimerképződés). Megállapítást nyert, hogy a fluorofórok kizárólag intermolekuláris dimereket képeznek mivel az excimerre jellemző sáv intenzitása koncentrációfüggést mutatott. Az excimerképzést kizáró a további kísérleteket 10<sup>-6</sup> M koncentráció tartományban végeztük, ahol a dimerizálódás mértéke elhanyagolható. Összehasonlítottuk a **3a-c** szenzorok fluoreszcencia-serkentés értékeit ammóniumsók jelenlétében. Az **1h**, **3a** összehasonlításban azt tapasztaltuk, hogy mindkét szenzornál a vendégmolekulák H-donor tulajdonsága határozza meg a serkentés mértékét azzal a különbséggel, hogy a **3a**-nál minden esetben mintegy kétszerese volt ez a serkentés. Ez konformációs dinamika jelenlétével értelmeztük, mivel a szimmetrikusan szubsztituált származék esetében hangsúlyosabb a komplexálódás miatt a HOST szerkezetében bekövetkező konformációváltozás. Az **1h** szenzor esetében ugyanis a GUEST molekulák szabadon hozzáférhetnek a HOST receptoregységéhez, míg a **3a** esetben ez csak

úgy lehetséges, ha a komplexálódást megelőzi az egyik kumarinegység térbeli elmozdulása. A vizsgálati eredmények alátámasztják, hogy a **3a** esetében nagyobb mértékű a szerkezetbeli torzulás, mint az **1h** rendszerénél ( $\Delta\delta$  értékek). A **3a**-nál megfigyelhető fluoreszcencia serkentés így két komponensből tevődik össze:

- a nitrogénatomhoz történő direkt koordináció (**1h**-nál kizárólagos)
- az ellenoldali nitrogén környezete mozgásszabadságának megváltozása

Így a **3a** szenzorban mindkét fluorofór bekapcsol, különböző mértékben. Külön ki kell hangsúlyozni, hogy a **3a** esetben a kumulatív hatás eredményeként nagyobb fluoreszcencia serkentéseket figyelhetünk meg annak ellenére, hogy nagyságrendekkel gyengébben képes az ammóniumsók koordinálására, mint az **1h**.



5. Ábra. Diaza-koronaéter szenzorok fluoreszcencia serkentése ammóniumsók jelenlétében

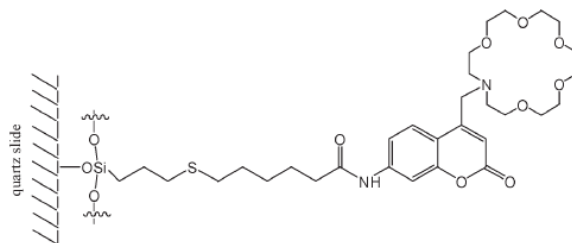
A **3b**, **3c** fluoreszcenciás vizsgálatai igen érdekes jelenségre világítottak rá. Ezen két szenzornál ugyanis, bár a fluorofórhoz képest ellenoldali szubsztituensek térigénye indokolná, nem figyeltünk meg nagyobb fluoreszcencia serkentési értékeket. Ezzel ellentétben minden esetben kismértékben ugyan, de csökkent a fluoreszcencia intenzitása. A jelenséget azzal magyaráztuk, hogy ezekben az esetekben a direkt koordináció a kumarimetil-csoporttal szemköti nitrogénhez történik, azok nagyobb bázicitása következményeként. Ezt NMR mérésekkel igazoltuk is. Valószínűsítjük, hogy az ellenoldali koordináció a kumarimetil-nitrogén körül olyan változásokat indukál ami még hatékonyabb fluoreszcencia kioltást eredményez.

*Az e témakörben elért eredményeink alapján megállapítást nyert, hogy a hagyományos, kizárólag a vendégmolekulák H-donor képességén alapuló elmélettel szemben egy másik mechanizmus is fluoreszcencia változást idézhet elő PET szenzorokban. Ez pedig a komplexálódás következtében kialakuló szerkezetbeli változások eredménye. A két hatás egymásra épülve alakítja ki a megfigyelhető fluoreszcencia változást. A pályázatban vállaltakhoz képest annyi változás történt, hogy a szenzor jelátviteli folyamatának megértését célzó kísérleteket kibővítettük, mivel érdekes problémába ütköztünk. Emiatt az a receptor méretének és szerkezetének saxitoxinra való optimalizálását célzó kísérletek nem kerültek sorra. Véleményünk szerint azonban ez a tervmódosítás mindenképpen eredményesnek tekinthető, hiszen a kísérletek egy fontos problémát tisztáztak.*

## 2. Szenzorfejlesztés

Munkánk ezen részében olyan módszert kívántunk kidolgozni, amely lehetővé teszi kiválasztott szenzorvegyületek szilárd hordozóra (kvarc, optikai szál) való kovalens rögzítését ezáltal olyan szenzort eredményezve amely alkalmas a célokban leírt toxin (saxitoxin) kimutatására. A módszer kidolgozásához monoaza-18-korona-6 éter alapú szenzort

választottunk, mivel ezen vegyület toxinfelismerő képessége már leírt az irodalomban. A szenzorvegyület kovalens rögzítését tioéter kötés kialakításával kívántuk elérni. Ehhez előállítottuk a szenzor bromoalkil-származékát, majd ezt reagáltattuk olyan kvarcüveggel amelynek felületét előzetesen tiol csoportokkal módosítottunk (6. Ábra). Spektrofotometriai és ellipszometriai jellemzések azt mutatják, hogy így módon a felület szenzor-borítottsága közel 80 %-os.



6. Ábra. Kvarcfelület kovalens módosítása szenzorvegyülettel

Az így módon előállított szenzor-prototípust teszteltük, vajon alkalmas-e a toxin kimutatására. A kísérletek eredményei arra engedtek következtetni, hogy már ezzel az egyszerű szenzorral is lehetővé válik a toxin kimutatása. A kimutatás érzékenysége pedig megközelítette a ma standardként használatos, ún. „egér bioassay”-t.

*A kidolgozott eljárás tehát hatékonynak nevezhető és a jövőben alkalmazható optikai szálak szenzorral való módosítására. Ezen kísérletek elvégzésére sajnos már nem jutott időnk. További feladat lenne a módszertani fejlesztés részben leírt „konformációs szenzorok” kiválasztása és optikai szálra való rögzítése.*