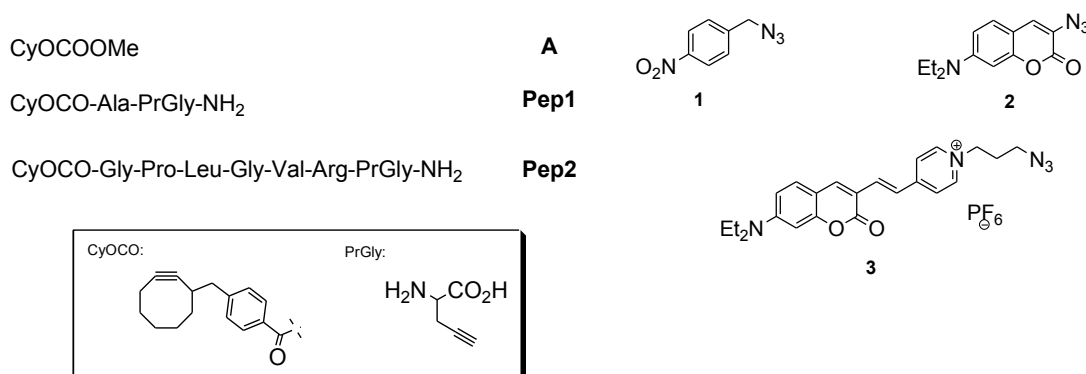


SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS AZ NKTH-OTKA H07-B-74291-ES SZÁMÚ PROJEKTHEZ

1. Szekvenciálisan jelölhető enzimszubsztrátok

A kutatás fő célja olyan mátrix-metalloproteináz enzim (MMP-2) szubsztrátok előállítása volt, amelyek lehetővé teszik annak két fluoreszcens jelzővegyülettel való jelzését, Fluoreszcens Rezonancia Energia Transzfer (FRET) rendszerű szubsztrátok előállítása céljából. Ennek első lépéseként olyan peptid alapú enzimszubsztrátot készítettünk, melyet propargil-, és jódbenzol funkciós csoportokat tartalmazó, nem természetes aminosavakkal (propargil-glicin, jódtirozin) módosítottunk. Tervünk az volt, hogy az első azid-tartalmú jelzővegyületet Cu(I) katalizált azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddícióval (ún. klick reakcióval) vigyük be. Ezt követően az aril-jodid részen kivitelezett Sonogashira kapcsolással újabb acetilén csoportot alakítsunk ki, majd a második jelzést az első jelzővegyülethez hasonlóan kapcsoljuk. Az ily módon kivitelezett, egy üstben szekvenciálisan végrehajtott Sonogashira-Klick reakciósor modellvegyületeken teszteltük, és a jó hozamok fényében úgy ítéltük meg, hogy ezen eljárás ígéretesnek tűnik biomolekulák kettős jelölésére (Lőrincz et al, Synthesis 2009, 3527 – 3532). Elgondolásunk működött is, sajnos azonban igen alacsony hozammal eredményezte a kettősen jelölt peptidet. Alternatív megoldásként a terminális acetilének és ciklooktinok reaktivitásbeli különbségét terveztük kiaknázni. Tudniillik, míg a terminális acetilének szobahőmérsékleten csak rézionok jelenlétében reagálnak azido csoport tartalmú vegyületekkel, addig a ciklooktinok a gyűrűfeszültség miatt nem igényelnek katalizátort.



1. Ábra. Szekvenciálisan jelölhető peptidok és az alkalmazott jelzővegyületek.

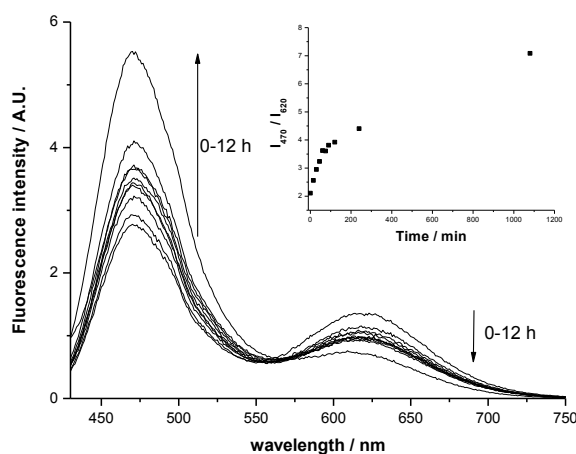
Előállítottunk tehát olyan szubsztrát-szekvenciát, melybe propargil-glicint, mint terminális acetilént tartalmazó aminosavat építettünk, illetve N-terminálisát cikloooktintartalmú karbonsavszármazékkal acileztük (1. Ábra). Ezen elgondolásunk beváltotta a hozzáfűzött reményeket. Sikerrel valósítottuk meg az ily módon módosított szubsztrát kettős jelölését szekvenciális módon. Az első azidtartalmú fluorofórt a cikloooktinhoz kötöttük, majd teljes konverziót követően réz (I) ionok jelenlétében reagáltattuk az acetilencsoportot a második azidtartalmú jelzővegyülettel. Az eljárás hatékonyságát jól jelzik a két lépés után megfigyelhető magas hozamok (1. Táblázat).

1. Táblázat. Dual labeling of model compounds^[a]

Entry	Model compound	Label 1	Yield 1 [%] ^[b,c]	Label 2	Yield 2 [%] ^[b,c]
1	Pep1	2	96	1	71
2	Pep1	2	98	3	73
3	Pep1	3	76 (66)	-	-
4	Pep2	2	>99 (82)	1	>99 (65)
5	Pep2	2	98 (89)	3	95 (60)
6	Pep2	3	78 (68)	-	-
7	Pep2	2	98	2	96

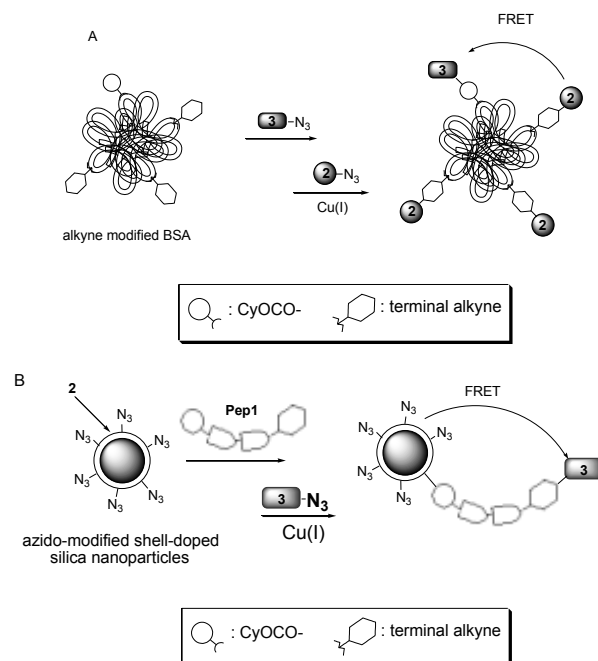
[a] Click reactions in solution [b] Determined by integration of the HPLC traces of the crude products at 220, 410 and 500 nm after 12 h
[c] numbers in parentheses indicate isolated yields

A kettősen jelölt enzimszubsztrátot ezt követően MMP-2 hatásának vetettük alá és követtük a fluoreszcens spektrum-beli változásokat. A mérési eredmények rámutattak, hogy az enzimatis hidrolízis mértékével arányosan a FRET kommunikáció a két fluorofór közt megszűnik (2. Ábra).



2. Ábra. Spectral changes of 2-Pep2-3 (1 μ M) in the presence of activated MMP-2 (4 nM) in TCNB buffer at 37 $^{\circ}$ C; inset: changes in the ratio of the monitored wavelengths

A módszer hatékonyságát egyéb rendszerek esetében is demonstráltuk. Így sikerrel valósítottuk meg egy fehérje kettős jelölését, illetve a peptidek kettős jelölését fluoreszcens szilika nanorészecskékkel és szerves fluorofórral (3. Ábra). (Az eredményekről bővebben ld. Kele et al Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48(2),344-347)



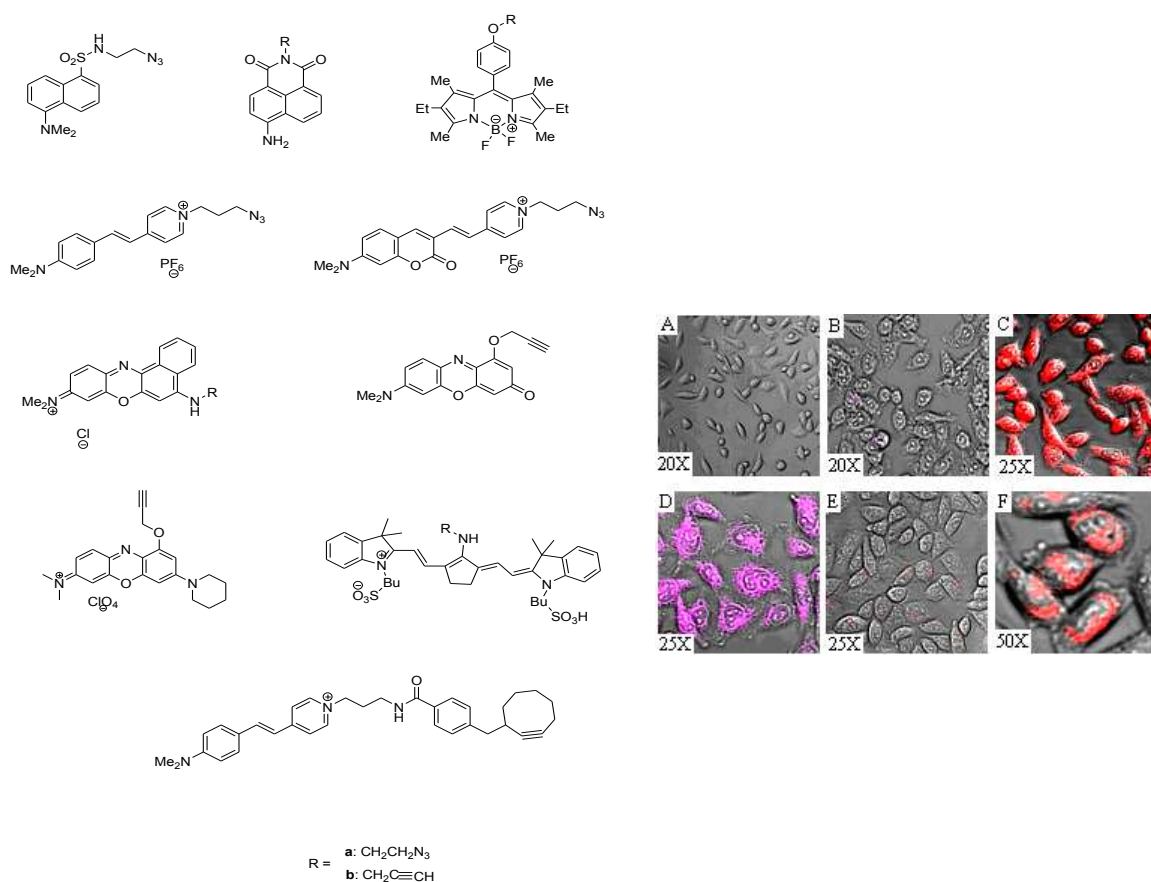
3. Ábra. BSA kettős jelölése (A); Peptid kettős jelölése nanorészecskével és szerves fluorofórral (B).

Ez utóbbi módszert sikerrel alkalmaztuk olyan MMP-2 szubsztráttal módosított fluoreszcens szilika nanorészecske kettős jelölésében, amellyel képesek voltunk az MMP-2 kimutatására igen kis koncentrációkban (1 μ M). (Az eredményekről bővebben ld. Achatz et al ChemBioChem 2009, 10, 2316 - 2320).

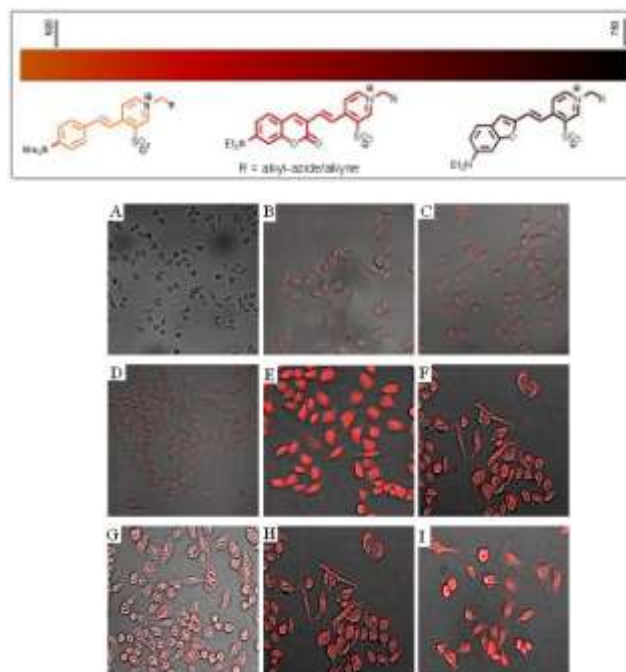
2. Klikk reakcióban alkalmazható fluorofórok előállítása

Munkánk egyik mellékágaként a kettős jelölésben alkalmazható, klikk reakcióba vihető fluorofórok számát kívántuk gyarapítani. Ezen kísérletek eredményeként egy sor azid, acetilén, vagy ciklooktin-tartalmú fluoreszcens vegyületet állítottunk elő, melyeket sikerrel alkalmaztunk úgy modellvegyületek, mint sejtek membránjának jelzésére. Különös jelentőséggel bírnak azon jelzővegyületeink, melyek a távoli vörös, közeli IR tartományban gerjeszthetők, illetve emittálnak. Ezek alkalmazásával ugyanis kiküszöbölhető az élő szervezetek ún. autofluoreszcenciája (háttérfluoreszcencia) ezáltal még jobb jel/zaj arányt

eredményezve. Előállítottunk olyan fluorofórokat is melyek az ún. „megaStokes” fluorofórok családjába tartoznak. Ezekre jellemző, hogy a gerjesztési és emisziós hullámhosszuk közti távolság (Stokes eltolódás) 100 nm feletti. Az ilyen fluorofórok alkalmazása különösen FRET alkalmazásokban jelentős, mivel az egyes fluorofórok gerjesztési és emissziós sávjai jól elválnak, ezáltal nagyobb detektálási érzékenységet eredményeznek. (Az eredményekről bővebben ld. Kele et al Org. Biomol. Chem 2009, 7, 3486 – 3490, illetve Nagy et al. Chem. Asian J. elfogadva.).



4. Ábra. Klikkelhető fluorofórok és alkalmazásuk sejtek jelölésében



5. Ábra. Klikk-megaStokes festékek és alkalmazásuk.

3. Összefoglalás

Az eredeti terveket sikerrel megvalósítottuk. A kezdeti nehézségeket (alacsony hozamú Sonogashira-Klikk szekvencia) megoldottuk oly módon, hogy kihasználtuk az acetilének és cikloalkinek eltérő reaktivitását. Az ily módon előállított peptideket sikeresen jelöltük magassal két fluorofórral. Módszerünk általános használhatóságát egyéb példákön is bemutattuk. Ezen kívül előállítottunk számos klikk reakcióra alkalmas fluoreszcens jelzővegyületet is. Ezek közül különösen jelentősek azok az ún megaStokes festékek amelyek a távoli vörös, közeli IR tartományban emittálnak.

Eredményeinkről a fent említett 5 folyóiratban (Angew. Chem. Int. Ed; Org. Biomol. Chem; Synthesis; ChemBioChem, Chem. Asian J.) adtunk számot, illetve részt vettünk az MTA Heterociklusos Munkabizottsági ülésén Balatonszemesen, és a Methods and Applications in Fluorescence (MAF) 11-ik kongresszusán Budapesten.

Budapest, 2009. november 23.

Kele Péter
egyetemi adjunktus