

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

CSERÉP BALÁZS GERGELY

Bioortogonális ligációra alkalmas tirozin-jelölő molekulák szintézise

Témavezető: Dr. Kele Péter

Kémiai Intézet



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———
——— Természettudományi Kar ——
— Budapest, 2010 —

Tartalomjegyzék

| | |
|---|----|
| Tartalomjegyzék..... | 1 |
| 1. Bevezetés..... | 2 |
| 2. Irodalmi áttekintés..... | 3 |
| 2.1. Bioortogonális ligáció..... | 3 |
| 2.2. Aminosavak és peptidek jelölése..... | 7 |
| 2.3. Szekvenciális jelölés..... | 9 |
| 2.4. Tirozin specifikus jelölése..... | 9 |
| 3. Saját eredmények – szintézisek..... | 11 |
| 3.1. Célkitűzések..... | 11 |
| 3.2. Rövidítésjegyzék..... | 12 |
| 3.3. Szintézisek..... | 13 |
| 3.3.1. A fluorofórt tartalmazó 1 festék szintézise..... | 14 |
| 3.3.2. Az (<i>E</i>)-8-azidookt-2-enil-acetát (2) kémiai hírvivő szintézise..... | 16 |
| 3.3.3. Az (<i>E</i>)-okt-2-én-7-inil-acetát (3) kémiai hírvivő szintézise..... | 16 |
| 3.3.4. A 3-azido-7-dietilamino-kumarin (4) szintézise..... | 17 |
| 3.4. Kapcsolódási vizsgálatok..... | 19 |
| 4. Kísérleti rész..... | 22 |
| 4.1. Általános..... | 22 |
| 4.2. Vegyületek szintézise..... | 23 |
| 5. Összefoglalás..... | 32 |
| 6. Köszönetnyilvánítás..... | 33 |
| 7. Irodalomjegyzék..... | 34 |

1. Bevezetés

A fehérjék, lipidek és más biopolimerek kémiai jelölésére alkalmas módszerek a biotechnológia, a gyógyszerkutatás és sok alapkutatás alkalmazhatóságának kulcsfontosságú tényezői. A zöld fluoreszcens fehérje (*green fluorescent protein, GFP*) felfedezése és sokrétű felhasználhatósága (amit 2008-ban Kémiai Nobel-díjjal is jutalmaztak) megmutatta a fluoreszcencián alapuló szelektív fehérjejelölés előnyeit a hely és a dinamikai tulajdonságok meghatározásában. A genetikailag kódolt csoportoknak ugyanakkor megvannak a saját korlátai. Így például nem alkalmazhatók a poszttranszlációs módosítások mesterséges utánzásakor, vagy a lipidek és más, nem direkt módon kódolt molekulák tanulmányozásakor. Ezen korlátok miatt a közelmúltban többféle, különböző típusú reakciókon alapuló módszert próbáltak ki, melyek során a biomolekula célzott funkciós csoportja és egy exogén, szintetikus vegyület közti bioortogonális ligáció volt a cél. Ezek közös jellemzője, hogy a sejteken belül mesterséges, azok belső folyamatait nem megzavaró funkciós csoportokat alakítanak ki, majd exogén módon bevitt, ezekkel szelektív módon reakcióba lépő, később detektálható molekulákkal jelölik meg őket. Ezek nyomon követése és az így nyert információk a biológia és gyógyszerkutatás számos területén felhasználhatóak, például fehérjetervezéskor, immunoassay tesztek fejlesztésekor (specifikus anyagok felismerése vagy koncentrációjának meghatározása az antigén-antitest kölcsönhatások segítségével) vagy a sejtek felszínének célzott módosításához, de akár a rákos sejtek specifikus megjelölésére is. Mivel a biomolekulák térbeli szerkezetét, így fizikai-kémiai tulajdonságait nagyon érzékenyen befolyásolhatja a természetestől eltérő oldalláncok bevitele, ezért akár egy-egy új funkciós csoport is dönthet arról, hogy a vegyület képes-e továbbra is betölteni a szervezetben természetes szerepét. Mindezek tekintetében az újfajta kapcsolódási pontokat létrehozó vagy kihasználó, a lehetőségeket bővítő jelölőmolekulák fejlesztése napjainkban is kiemelt aktualitást élvez.

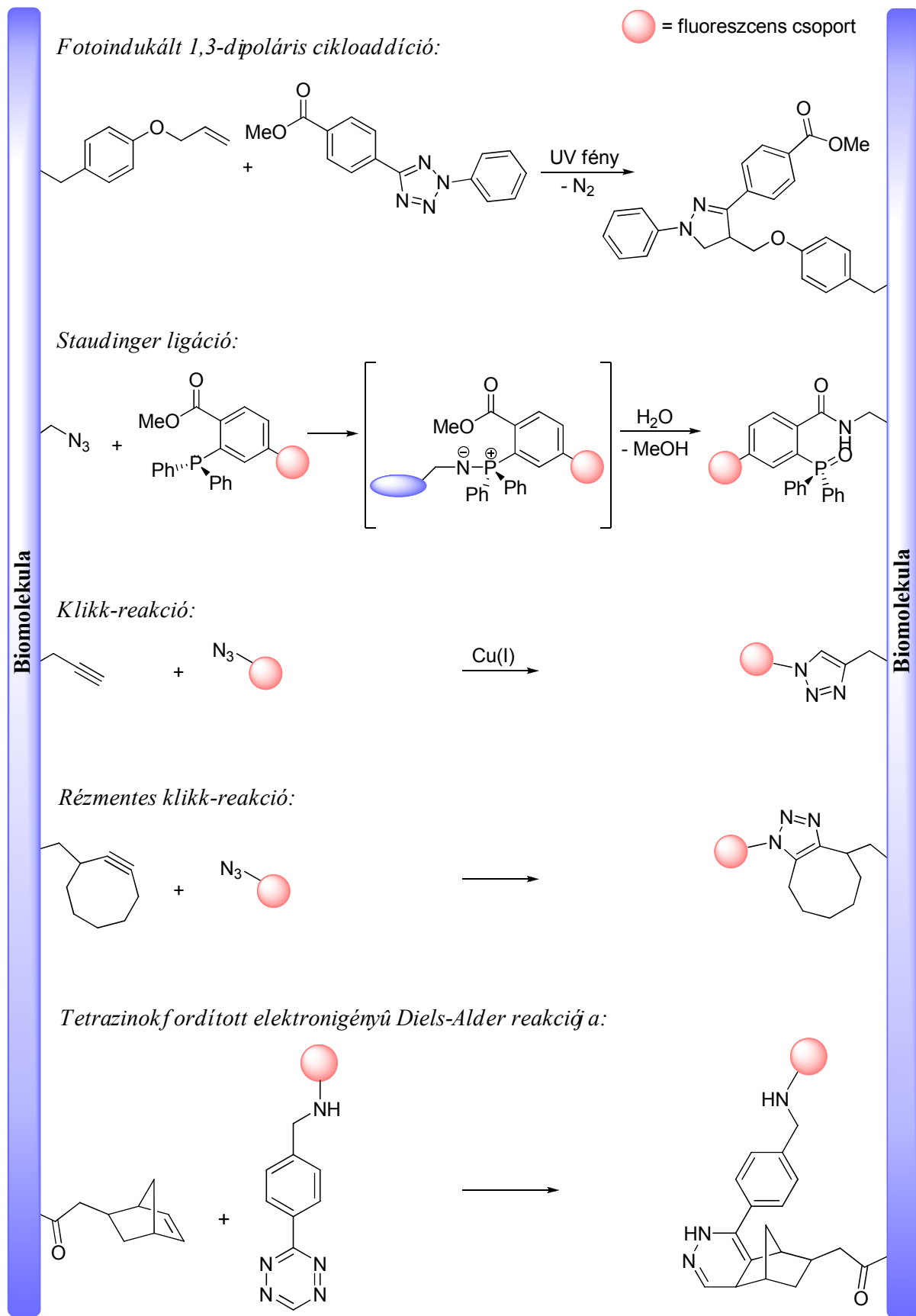
2. Irodalmi áttekintés

2.1. Bioortogonális ligáció

Az élő sejtek belsejében található molekulák jelölése és nyomon követése sok kutatás feltétele. Ennek legcélravezetőbb módja a bioortogonális ligáció [1], melynek lényege, hogy két funkciós csoport szelektív, fiziológiás körülmények között lejátszódó nagy hatékonyságú, egymásra nézve szelektív reakciója révén stabil kovalens kötés alakul ki. A bioortogonális funkciós csoportokkal szemben támasztott további feltételek, hogy biológiailag inertek legyenek, vagyis a célvegyületen kívül ne reagáljanak más biomolekulákkal, valamint biokompatibilisek, vagyis nem toxikusak. Mindezek mellett az is fontos szempont, hogy a reakciók gyorsan, legalább a vizsgált biológiai folyamatok sebességével összemérhetően játszódjanak le akár alacsony koncentráció tartományban is, illetve a kapott termék detektálható legyen. Ezt egyszerű és inert módon például fluoreszcens csoport beépítésével lehet elérni.

A rendelkezésünkre álló lehetséges kémiai reakciók és átalakítások közül csak néhány felel meg ezen elvárások nagyobb részének. Az eddig leírt, biortogonális ligációra alkalmas reakciók az alábbiakban foglalhatók össze (*1. ábra*):

- Alkének és tetrazolok fotoindukált cikloaddíciója [2-4], mely reakció előnye, hogy szelektíven és gyorsan ($k_2 = 10^1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ nagyságrendű sebességi együttható is elérhető), csak adott hullámhosszú fényvel való besugárzás hatására játszódik le. A módszer további előnye, hogy a termék, a kiindulási anyagokkal ellentétben fluoreszcens, így a reakció lejátszódása direkt módon is nyomon követhető.
- Azidok reakciója foszfinokkal, közismert néven Staudinger-ligáció [5]. A reagensek biokompatibilisek, hátránya a viszonylag alacsony reakciósebessége ($k_1 = 0,4 \text{ s}^{-1}$ és k_2 csak $\sim 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) és az a tény, hogy a foszfinszármazék spontán is oxidálódik, ezáltal rontva a jelölés hatékonyságát.
- Réz-katalizált alkin-azid 1,3 dipoláris cikloaddíció, a leggyakrabban klikk-reakció néven említett reakció. [6-11] Jelentőségét a $k_2 \sim 10^1 - 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ nagyságrendű sebességi állandóval jellemezhető reakciósebessége, a Cu(I) katalizátor jelenlétében kvázi kvantitatíve lejátszódó reakció és a széleskörű alkalmazhatósága adja.

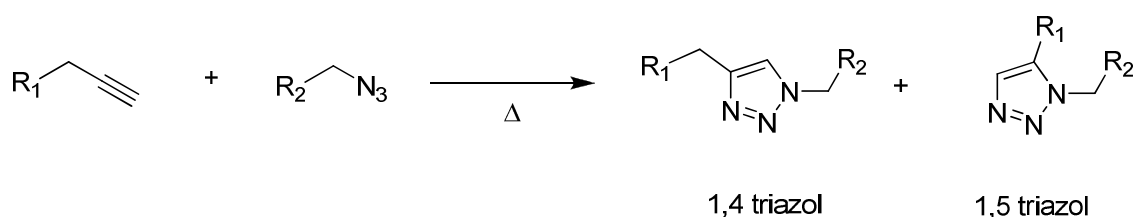


1. ábra. A bioortogonális ligáció fajtái.

- Rézmentes (gyűrűfeszültség által kiváltott) klikk reakció. [12-15] Az alkin csoport energiatartalmának növelése miatt nem igényli a katalizátor jelenlétét, viszont az alkalmazott ciklooktinszármazékoktól nagyban függ a reakció sebességi állandója, amely széles tartományban változhat, kb. $k_2 = 1,2 \times 10^{-3} - 1,4 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Hátránya, hogy a gyorsabb reakciókhoz bonyolult, csak sok lépésben előállítható származékok szükségesek, így a költségek magasabbak a katalizátort használó eljárásnál.
- A tetrazinokra épülő fordított elektronigényű Diels-Alder reakciók [16-21], melyek során egy elektrondús olefin- vagy acetilén-származék és egy elektronhiányos tetrazin reakciójában nitrogéngáz kilépése közben piridazin, vagy a kiindulási olefin szubsztituenseitől függően 4,5-dihidropiridazin-származék keletkezik. A módszer bioortogonális jelölések céljára, vagy célzott funkciós csoportok bevitelére rendkívül jól felhasználható, mert a biokompatibilitás mellett a reakciósebesség is nagyban befolyásolható a tetrazin szubsztitúciójával. A gyűrű elektronhiányosságának vagy a kettes-, illetve hármas kötés reaktivitásának tovább növelése (például feszült gyűrűbe építésével) az összes eddiginél gyorsabb ($k_2 \sim 10^1 - 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ nagyságrendű) módszert eredményez, melynek a rézmentes klikk reakciókhoz hasonlóan a hátránya az esetlegesen bonyolult reagensek használata.

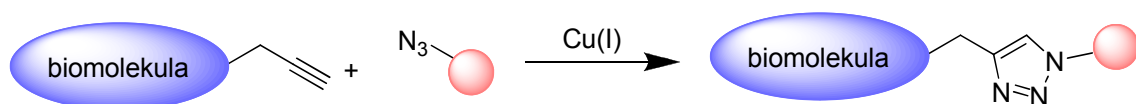
Cu(I) katalizált azid-alkin dipoláris reakció

A „klick-kémia”, mint kémiai fogalmat Barry K. Sharpless vezette be 2001-ben a természetben megfigyelt folyamatok alapján. Olyan reakciókra alkalmazta melyek lehetőséget adnak vegyületek gyors és megbízható előállítására kisebb egységek összekapcsolásával (modularitás).[6] Ennek egyik legnépszerűbb képviselője a Huisgenről elnevezett azid-alkin 1,3-dipoláris cikloaddíció Cu(I) ionok által katalizált formája (*CuAAC*, *Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*). [7] Az eredeti reakció (2. ábra) során a melegítés során bekövetkező reakció terméke vegyesen az 1,4-triazol-származék és az 1,5-triazol-származék.



2. ábra. A Huisgen reakció.

Sharpless és Meldal által továbbfejlesztett módszer [8,9] fő komponense a Cu(I) katalizátor, minek hatására sok tekintetben nagyon kedvező tulajdonságú reakciót kaptak (3. ábra): szerves és vizes közegben is lejátszódik, széles pH-tartományban (pH= 3 – 10), közel 100%-os konverzió mellett és egyes esetekben akár $k_2 \sim 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ nagyságrendű sebességi állandóval jellemezhető. A reakció külön érdekessége, hogy a Cu(I) katalizátor jelenlétében kivitelezett cikloaddíció kizárólag az 1,4-regioizomert adja. A biológiai rendszerekre, illetve élő sejtekre jellemző extrém kis azid- és alkin előfordulás tovább növeli a módszer felhasználhatóságát és bioszelektivitását.[10,11] Mindezek mellett hátránya a Cu(I) magas citotoxicitása, így az újabb, fémmentes módszerek megjelenése óta kissé visszaszorult vezető szerepéből.



3. ábra. Cu(I)-katalizált alkin-azid 1,3-dipoláris cikloaddíció (klick-reakció).

2.2. Aminosavak és peptidek jelölése

A peptidek és fehérjék jelölésére a rendelkezésre álló kiindulási anyagok és módszerek függvényében többféle lehetőség kínálkozik. Ezek két fő csoportba sorolhatóak aszerint, hogy az aminosav funkcionálizálása a beépítése előtt vagy utána történik meg. Az első csoportba tartozó módszerek esetében általában izotópjelölt, vagy egy természetes aminosavra hasonlító, fluoreszcens oldallánccal rendelkező mesterséges molekulákat alkalmaznak a célvegyület megjelölésére. A második csoportba tartozó módszerek további két alcsoportba sorolhatóak aszerint, hogy a funkcionálizálási reakció specifikusan csak egy adott aminosav oldalláncon való módosítását jelenti-e, vagy új peptidkötés kiépüléséről van-e szó a lánc valamelyik végén. A legjobb módszer kiválasztása mindig a céltől függ és minél több lehetőség közül lehet választani, annál könnyebb ilyet találni.

Izotópjelölés

Az aminosavakba beépített izotópok lehetnek stabilak (^{13}C vagy ^{15}N) vagy radioizotópok (^3H , ^{14}C , ^{18}F , ^{35}S , ^{125}I). Míg a stabil izotóppal való jelölési módszereket elsősorban peptidek, fehérjék konformáció-analíziséhez alkalmazzák (például többdimenziós NMR vizsgálatokhoz), addig a radioaktív jelölési technikák pl. sejtekben, illetve szövetekben való behatolási vizsgálatok esetében célravezetőek. Hátrányuk, hogy az ilyen aminosavak drágák és bomló nuklidok esetén a felhasználásukat és a vizsgálatukat minél hamarabb el kell végezni. A detektorok felbontása miatt sejten belüli pozíció már nem határozható meg rutinmérések során, továbbá egészségkárosító hatásuk is lehet a sejtek számára.

Mesterséges aminosavak

A mesterséges, előre funkcionálizált aminosavak tárháza elvileg végtelen és csak a vegyész fantáziáján és ügyességén múlik ezek előállításuk. Általánosságban elmondható róluk, hogy célszerűen fluoreszcens csoportot (például kumarin, fluoerszein vagy rodamin származékot), vagy további átalakításra, illetve kapcsolásra lehetőséget adó funkciós csoportot (például alként, alkint, azidot, norbornént vagy tetrazolt) tartalmaznak. Néhány esetben készen megvásárolhatóak, de gyakran gyorsabb, egyszerűbb és olcsóbb ezeket helyben előállítani. A peptidlánca való beépítésük során figyelembe kell venni, hogy lehetőleg hasonló nagyságú

és polaritású aminosav helyére kerüljenek, így a lehető legkevésbé befolyásolják az eredeti peptid vagy fehérje natív szerkezetét, vagy aktív centrumát. Ezek teljesülése esetén sokféle célra felhasználhatóak, többek közt sejtbejutási tesztekhez, sejtjelölésre vagy FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) rendszerekbe építve [22] fehérje – ligandum, illetve fehérje – fehérje kölcsönhatások vizsgálatára is.

Nem-specifikus jelölés

Peptidek nem-specifikus jelölése történhet az N-terminálison, vagy reagensek számára hozzáférhető lizin aminosavak esetén annak oldalláncon, különféle amino-reaktív jelzővegyületek segítségével (pl. aktív észterek, izotiocianátok). Az ilyen módosítások esetén más aminosavak oldalláncai is reakcióba léphetnek, ezért általában a védőcsoportok (illetve szilárd fázisú peptidszintézis esetén a gyantáról való) hasítása előtt kerül rá sor. Ez a leggyakrabban felhasznált módszer, viszont kizáró oka, ha az eredeti funkció betöltéséhez szükség van a szabad vagy csak kis térigényű csoporttal lezárt (acetilezett) amin csoportra.

Aminosav-szelektív jelölés

Az egyes aminosavakra specifikus, azaz csak a célzott oldallánccal reagáló funkciók csoportokkal ellátott jelölőmolekulákra [23] való igény az utóbbi években egyre nő, ugyanis a kisebb pl. epitóp peptidek fizikai - kémiai tulajdonságait nagyban befolyásolhatja akár egy láncvégi nagyobb fluoreszcens csoport vagy egy további beépített aminosav is. Ilyenkor jelenthet megoldást a lánc egy másik részén történő jelölés, amihez viszont csak az ott elhelyezkedő csoportok használhatóak fel. Jelenleg csak a cisztein –SH csoportját kihasználó vegyületekre létezik ilyen szelektív jelölést lehetővé tevő módszer [24], bár az elmúlt években ígéretes technikák jelentek meg, melyek pl. tirozin aromás –OH-ját szelektíven jelölő [26,30], illetve hisztidinre érzékeny, kovalensen kapcsolódó vegyületek fejlesztését jelentik.[31]

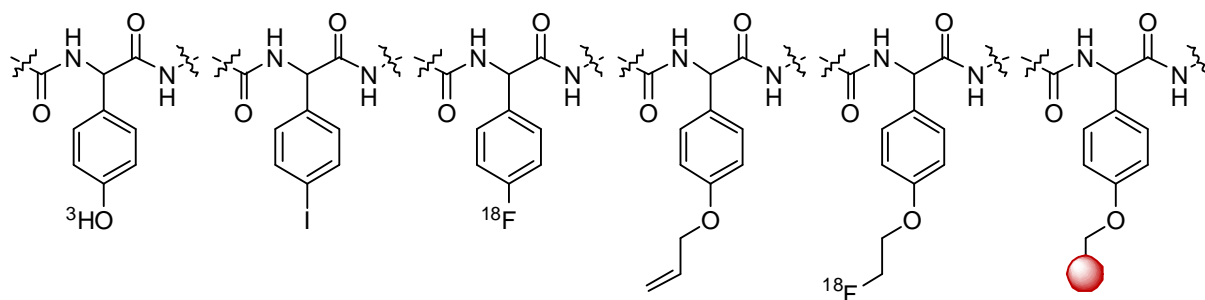
2.3. Szekvenciális jelölés

Biomolekulák szekvenciális jelölésén olyan technikai eljárásokat értünk, melyek során a célvegyületet először egy kémiai hírvivő molekulával (*chemical reporter*, egy kisebb, bifunkciós vegyület) módosítjuk, majd az így kapott mesterségesen funkcionáliszt specieszetet egy második lépésben reagáltatjuk a jelzést hordozó vegyülettel.[25] A módszer számos előnnyel rendelkezik:

- A kis hírvivő molekulával nehezebben hozzáférhető aminosavak is módosíthatóak.
- Szintén méretéből adódóan nagy valószínűséggel nem befolyásolja túlságosan a peptid vagy fehérje harmadlagos szerkezetét, sejtbehatolási képességét, funkciójának betöltését és egyéb tulajdonságait.
- Nem szükséges drága, mesterséges aminosav előzetes beépítése a peptidbe / fehérjébe.
- Bioortogonális ligációval könnyen hozzákapszolható a sokféle lehetőség közül az adott feltételek mellett legjobbnak ítélt fluoreszcens festék.
- Olyan fluorofórok alkalmazásával, melyek önmagukban nem fluoreszcensek és csak a ligációt követően válnak azzá (például a 3-azido-7-dietilamino-kumarin), minimalizálható az elreagálatlan kiindulási vegyület miatti háttérfluoreszcencia, így nagyban javítható a jel/zaj arány és a kimutatási határ.

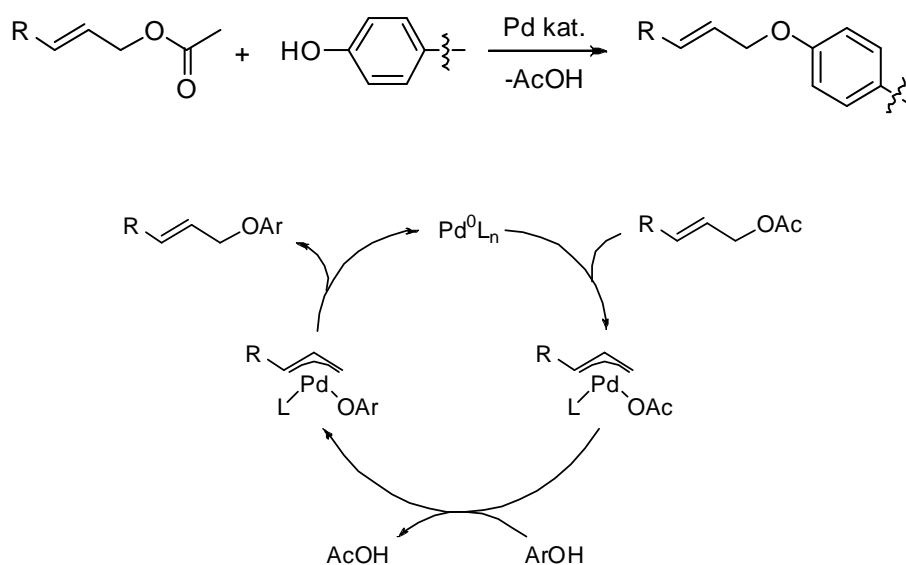
2.4. Tirozin specifikus jelölése

Egészen a közelmúltban megjelent eredményekig a tirozin csak előre módosított formában került felhasználásra, mint jelölt (izotóppal vagy fluorofórral), vagy további kapcsolásra alkalmas oldallánccal ellátott aminosav (4. ábra).



4. ábra. A leggyakoribb előre jelölt tirozin-származékok.

Szelektív jelölhetőségét a természetes aminosavak között egyedüli aromás hidroxil-csoportja teheti lehetővé. Nukleofil jellegét kihasználható Tilley és Francis figyelme az átmeneti fém (Pd) katalizálta reakciók között már tanulmányozott π -allilpalládium komplexek felé fordult.[26] Régebb óta ismert [27-29], hogy allil-alkoholok, -észterek és -karbonátok fenolos -OH csoportokkal katalizátor (főleg palládium, de segítheti titán vagy irídium is) jelenlétében allil-étereket képeznek. A reakciónak peptidek és fehérjék tirozinon megvalósítható jelölésének szempontjából való hátránya, hogy reakcióba léphetnek alifás -OH (szerin) vagy -NH₂ (lizin) csoportokkal is. Tilleyék a körülmények módosításával és vízoldható foszfán típusú ligandumok használatával elérték, hogy a kapcsolás vizes közegben és specifikusan csak aromás alkoholok esetében játszódjon le. Az általuk kidolgozott módszer további előnye, hogy az alkalmazott allil-acetát esetében melléktermékként a biológiai rendszereket kevésbé zavaró ecetsav képződjön (5. ábra). Ezen eljárás ötletét továbbfejlesztve Ma és Li [30] a közelmúltban egy másik festék segítségével a közeg polaritására érzékeny jelölőmolekulát állított elő. Ezen utóbbi vegyület segítségével képesek voltak a fehérje aktív centrumának térbeli változásait nyomon követni.

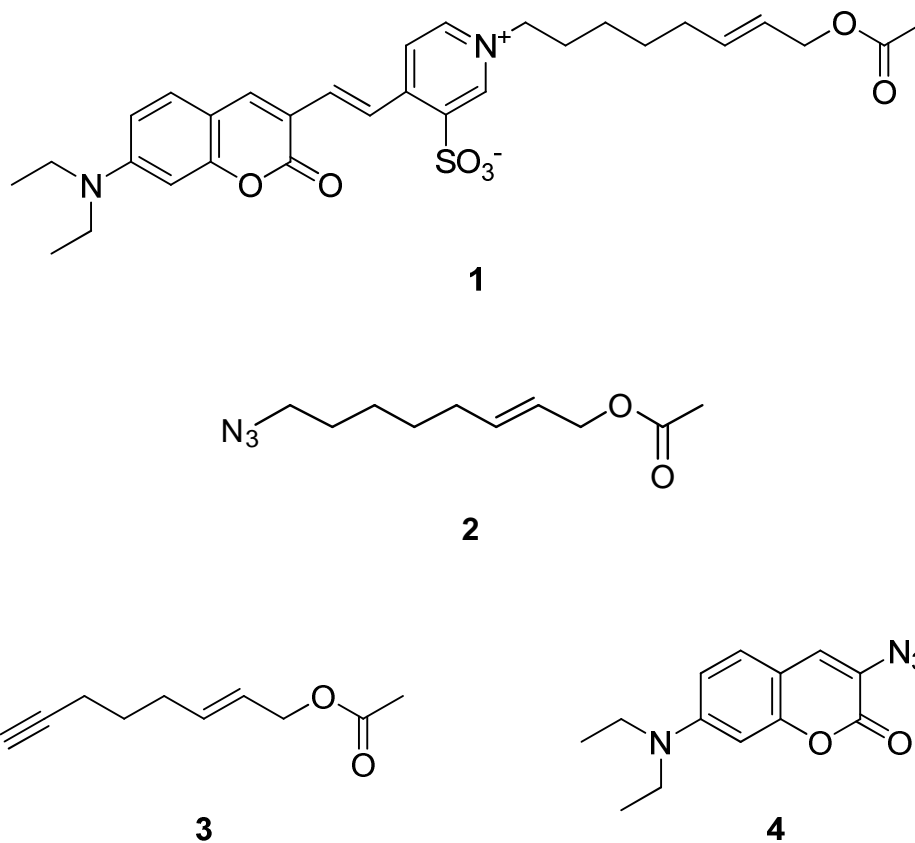


5. ábra. Aromás -OH reakciója allil-acetáttal Pd jelenlétében és a katalitikus ciklus.

3. Saját eredmények – szintézisek

3.1. Célkitűzések

Munkám során célul tűztem ki olyan fluoreszcens, bioortogonális ligációra alkalmas, tirozinra specifikus jelzőmolekula (**1**) előállítását, amely spektrális tulajdonságai miatt ideális peptidok és fehérjék jelölésére, sejtbejutási vizsgálatokra és sejtek fluoreszcens jelölésére. További céлом volt ezen alapuló kémiai hírvivő molekulák (**2,3**) előállítása, illetve módosítása például 3-azido-7-dietilaminokumarinnal (**4**) (6. ábra). Ugyancsak terveztem a szelektivitás tesztelését és modellkísérletek során peptidok és fehérjék fluoreszcens jelölését is.



6. ábra. Tirozin-jelölésre alkalmas célvegyületek és a klikk-reakcióba vihető fluorofór

3.2. Rövidítésjegyzék

A dolgozatban használt rövidítések:

| | |
|---------------------|---|
| Ac ₂ O | ecetsavanhidrid |
| DIBAL-H | diizobutil-alumínium-hidrid |
| CDCl ₃ | deutero-kloroform |
| DCM | diklórmétán (metilén-klorid) |
| DMAP | 4-dimetilamino piridin |
| DMF | <i>N,N</i> -dimetil-formamid |
| DMSO | dimetil-szulfoxid |
| DMSO-d ₆ | perdeuterált dimetil-szulfoxid |
| EtOAc | etil-acetát |
| Hex | hexán izomerelegy |
| MeCN | acetonitril |
| MS | tömegspektroszkópia |
| HRMS | nagyfelbontású (<i>high resolution</i>) MS |
| NMR | mágneses magrezonancia (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) |
| ¹ H-NMR | proton/hidrogén atom NMR |
| ¹³ C-NMR | 13-as szén izotóp NMR |
| TBTA | tris[1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-amin |
| TEA | trietyl-amin |
| r.t. | szobahőmérséklet (<i>room temperature</i>) |
| THF | tetrahidrofurán |
| TPPTS | trifenilfoszfino-3,3',3''-trisulfonsav trinátrium sója |
| VRK | vékonyréteg kromatográfia |

3.3. Szintézisek

Az **1** festék előállítását két lépésben valósítottam meg: először a Tilley és munkatársai által kidolgozott eljáráshoz hasonlóan [26] primer hidroxid csoportból kiindulva alakítottam ki a szelektíven tirozinnal reagáló allil-acetát funkciós csoportot (**9**). Ezt a vegyületet a lánc másik végén található halogén szubsztituens segítségével 4-metilpiridin-3-szulfonáthoz kapcsoltam (**11**). A kapott betain típusú pikolínium prekuzort pikolinkondenzációs reakcióban 7-dietilamino-3-formilkumarinnal reagáltattam. Az így nyert **1** vegyület fluoreszcens csoportja az úgynevezett mega-Stokes fluorofórcsaládba tartozik [11], azaz az emissziós hullámhossz maximumának távolsága a gerjesztési hullámhosszától (a Stokes-eltolódás) több mint 100 nm, így a gerjesztő fotonok nem zavarják detektálást, továbbá az emisszió a távoli vörös – közeli IR, vagyis a sejtekre nézve legnagyobb áthatolási képességű tartományba esik.

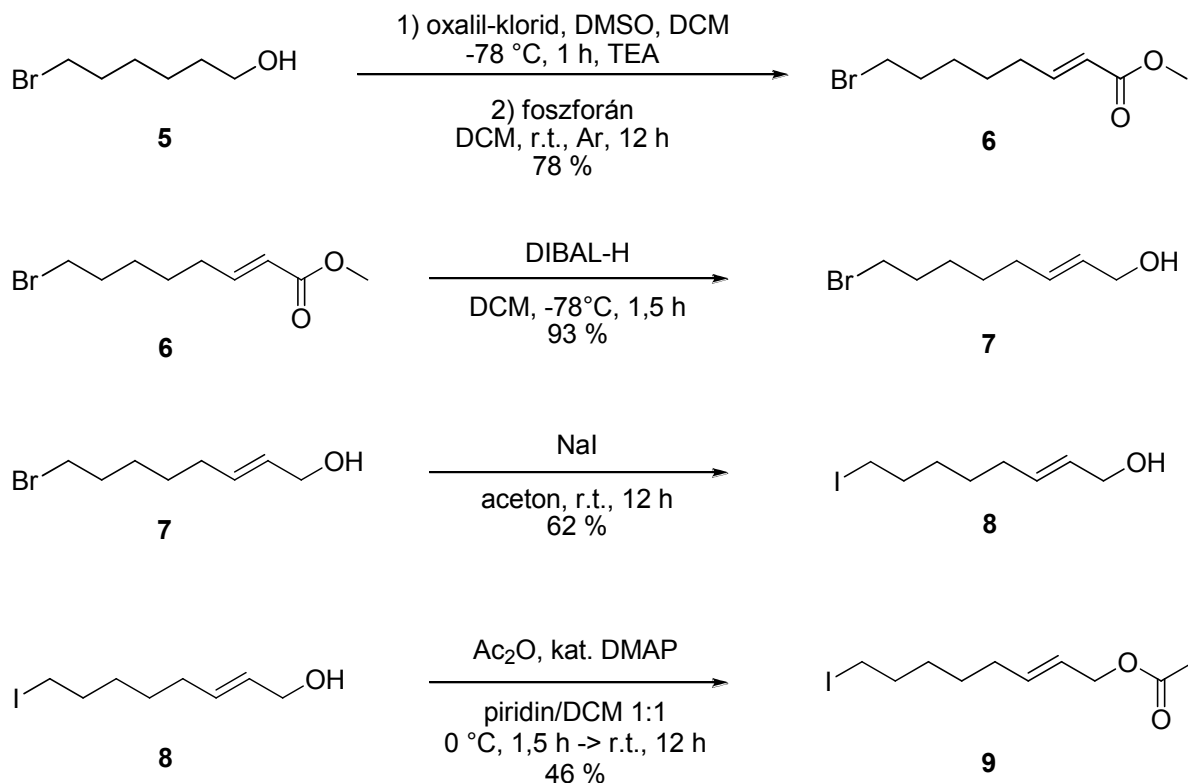
A **2** kémiai hírvivő molekulát az addigi tapasztalatok alapján hasonló módon, a bróm – jód szubsztitúció után egy jód – azid cserét elvégezve, de az optimalizációnak köszönhetően már jobb termeléssel sikerült előállítani.

A **3** kémiai hírvivő molekulához az előzőekkel analóg, de halogén helyett láncevégi alkin csoportot tartalmazó kiindulási anyagot használtam fel. Ehhez klikk-reakcióval gyorsan és egyszerűen kapcsolhatóak azid funkciós csoportú fluorofórok, így kihasználható a korábban már említett előnyöket reakciópartnerként az önmagában nem fluoreszcens 3-azido-7-dietilamino-kumarint (**4**) készítettem el hozzá.

3.3.1. A fluorofórt tartalmazó 1 festék szintézise

Elsőként 6-bróm-hexan-1-olt (**5**) oxalil-klorid és vízmentes dimetil-szulfoxid segítségével oxidáltam (Swern-oxidáció) $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd a képződő aldehidet *in situ* előállított megfelelő foszforánnal reagáltatva Wittig-reakcióval akrilát típusú vegyületet kaptam. Az így nyert **6** terméket oszlopkromatográfiás tisztítás után feleslegben lévő diizobutil-alumínium-hidrid (DIBAL-H) oldatával hűtés közben redukáltam, a keletkezett **7**-es bróm-okténol bróm, illetve az oxalil-klorid miatt részben klórra cserélődött halogén szubsztituensét az egységes termék és a később szükséges jobb reaktivitás érdekében acetone oldószerben nagy mennyiségű NaI segítségével jódra cseréltem (**8**).

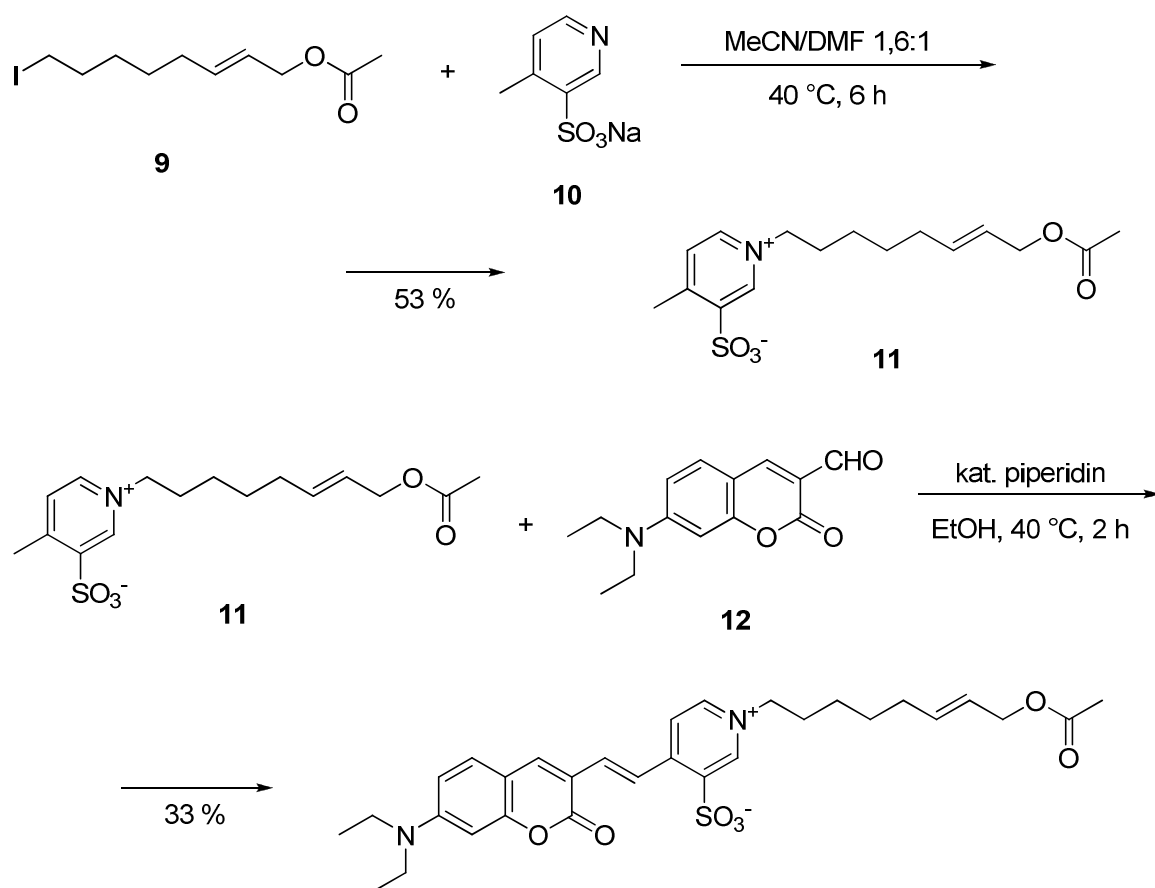
A kapott **8** alkoholt ecetsavanhidriddel piridin:diklórometán 1:1 arányú elegyében DMAP katalizátor segítségével acetát-észterre alakítva további tisztítás szükségessége nélkül a **9**-es vegyülethez jutottam (7. ábra).



7. ábra. Az allil-acetát funkciós csoport kialakítása

A fluorofór csoport kialakításának első lépéseként a kutatócsoportban korábban előállított és rendelkezésre álló 4-metilpiridin-3-szulfonát sót (**10**) N-alkileztem a **9** jódvegyülettel és így a **11**-es, pikolínium belső sóhoz jutottam. A reakcióidőt és termelést nagyban befolyásolja a hőmérséklet, ám a tapasztalatok szerint az allil-acetát 60 °C környékén teljesen elbomlik (diénné alakul), ezért köztes megoldásként a reakcióelegyet az irodalomhoz képest csökkentett hőfokon (refluxhőmérséklet helyett 40 °C) és időtartamig (12 óra helyett 6 órán keresztül) kevertetem. Az oszlopkromatográfiás tisztítást követően 50 % feletti termelést sikerült elérnem.

Mivel a **11** pikolinszármazék 4-es helyzetben levő metilcsoportja lazított protont tartalmaz, így aldehidekkel kondenzációs reakcióba vihető. Ennek alapján utolsó lépésként a **12** kumarin-aldehid származékkal reagáltattam katalitikus mennyiségű piperidin jelenlétében 40 °C-on etanolban. Oszlopkromatográfiás tisztítás után a terméket lila színű szilárd anyagként kaptam meg (8. ábra).

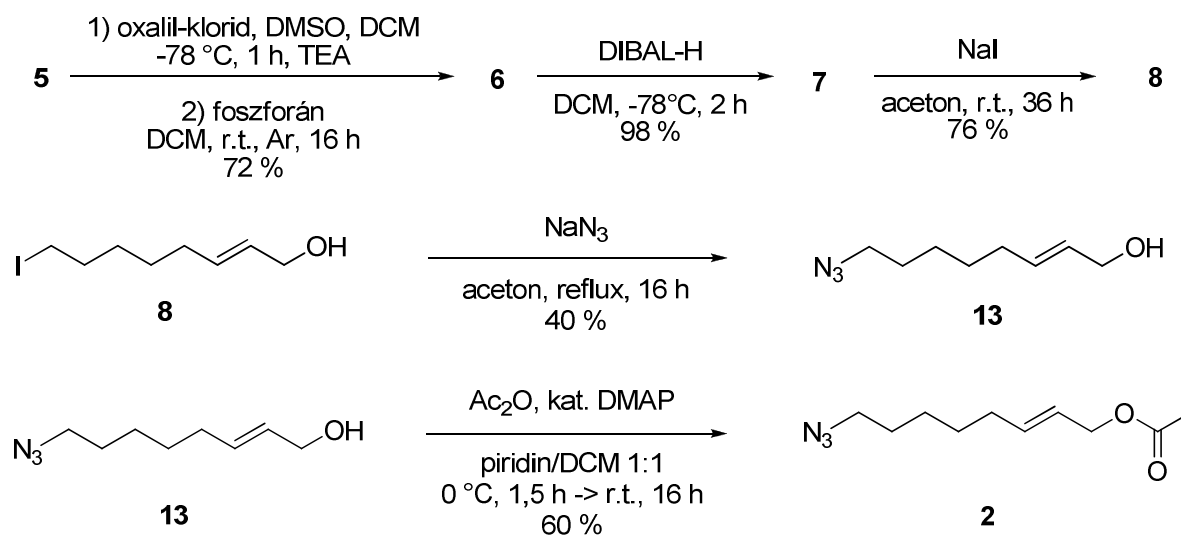


8. ábra. A fluorofór egység kialakítása.

3.3.2. Az (E)-8-azidookt-2-enil-acetát (2) kémiai hírvivő szintézise

A 2-es célvegyület előállítása során szintén 6-brom-hexan-1-olból (5) indultam ki. Az korábbiakban ismertetett módon jutottam el a 8 jód-szubsztituált alkoholhoz. A közben három lépés együttes kitermelését eközben a reakcióidők megnövelésével, illetve az első lépésben a DCM oldószer előzetes vízmentesítésével körülbelül harmadával sikerült javítani.

A 8-as vegyületből NaN_3 segítségével acetonban való refluxoltatással jód – azid szubsztitúciót hajtottam végre. A közepes termelés ellenére egyszerű tisztítási eljárás segítségével a tiszta 13 anyaghoz jutottam, majd a hidroxil-csoportot a már ismertetett módon ecetsavanhidriddel észterésítettem mely lépést követően a kívánt 2-t, mint sötét sárga színű olajat izoláltam (9. ábra).



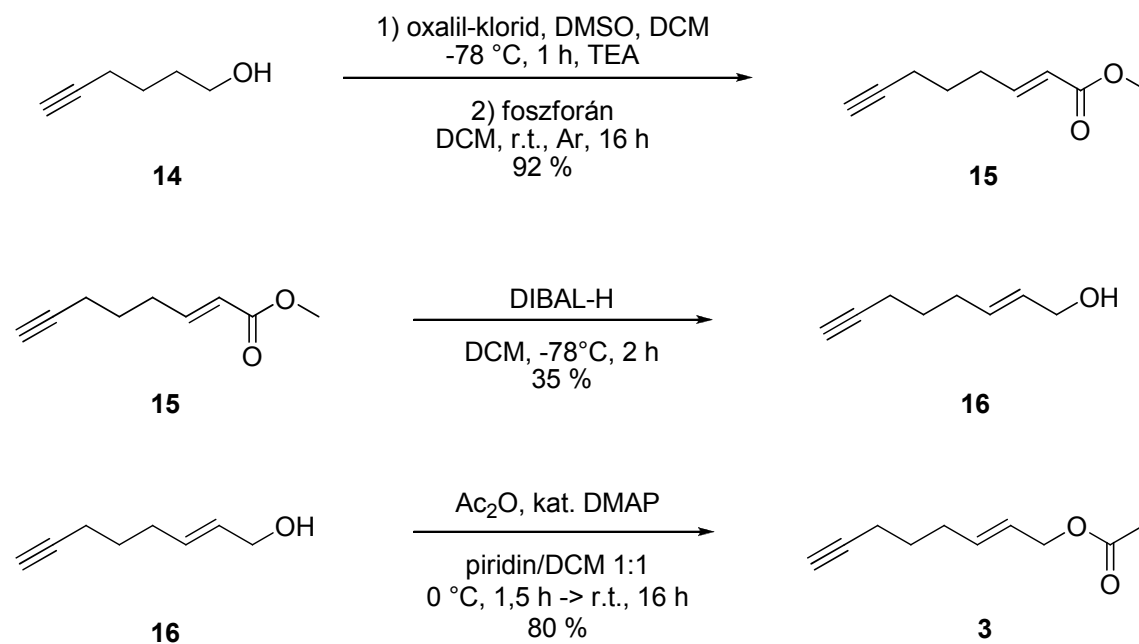
9. ábra. Az azid funkciós csoportú hírvivő molekula szintézisútja.

3.3.3. Az (E)-okt-2-én-7-inil-acetát (3) kémiai hírvivő szintézise

Az alkin funkciós csoporttal rendelkező tirozin-jelölő molekulát hex-5-in-1-olból (14) kiindulva valósítottam meg. Ehhez az előzőekkel analóg módon Swern-oxidáció és Wittig-reakció útján a 15 akrilát típusú vegyülethez jutottam nagyon jó kitermeléssel (valószínűleg az alkin csoport inertisége miatt a melléktermékek képződése a halogénekéhez képest visszaszorult). Ezt a vegyületet oszlopkromatográfiás tisztítás után feleslegben vett DIBAL-H oldattal redukáltam -78 °C-on a megfelelő 16 allil-alkohollá. A vártnál alacsonyabb termelés

a reagens állás közbeni koncentráció csökkenésével volt magyarázható és az oszlopkromatográfiás elválasztás során valóban visszanyertem a kiindulási anyag jelentős mennyiségét.

Az **3** céltermék allil-acetát funkciós csoportját a **2** előállításakor alkalmazott körülmények között alakítottam ki (10. ábra). A termék ebben az esetben is sárga színű, viszkózus folyadék volt.



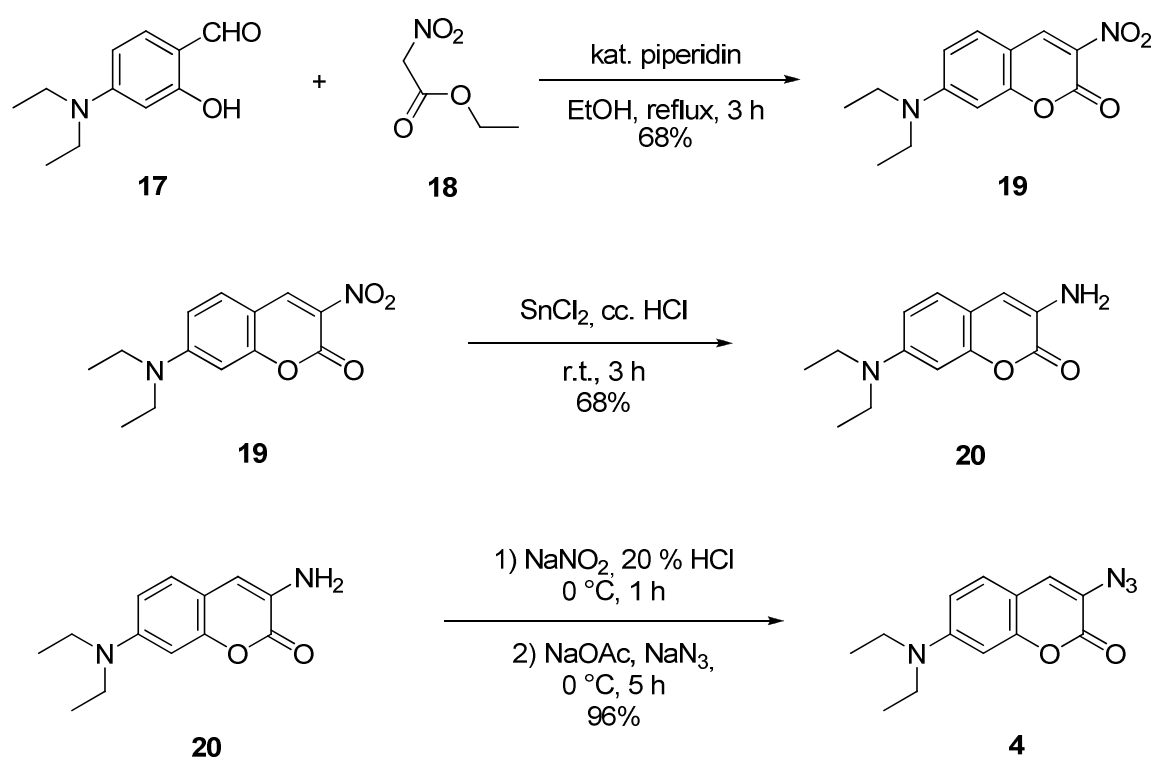
10. ábra. Az alkin funkciós csoportú hírvivő molekula szintézisútja

3.3.4. A 3-azido-7-dietilamino-kumarin (4) szintézise

A klikk kapcsolásra alkalmas, azid funkciós csoporttal rendelkező kumarin-származékhoz irodalmi analógia alapján [32], de vékonyréteg kromatográfiás követés segítségével le-rövidített reakcióidőkkel jutottam. Elsőként a **19** 7-dietilamino-3-nitro-kumarint állítottam elő 4-dietilamino-szalicilaldehid és etil-nitroacetát kondenzációjával etanolban katalitikus mennyiségű piperidin jelenlétében (Knoevenagel kondenzáció, majd intramolekuláris átésztereződés). A reakciót VRK-val követve a kiindulási anyag 3 óra alatt teljesen elfogyott, a termék pedig csapadékként kiváló narancssárga színű anyag volt, ami szűrés és mosás után külön tisztítást nem igényelt.

A nitrocsoport redukcióját nagy feleslegben alkalmazott SnCl_2 segítségével végeztem tömény sósavas közegben, 3 órányi szobahőmérsékleten való kevertetés során. A 3-as pozícióban aminocsoportot tartalmazó **20** kumarin-származékot éteres extrakció és hexánnal való eldörzsölés után sötétsárga szilárd anyagként izoláltam.

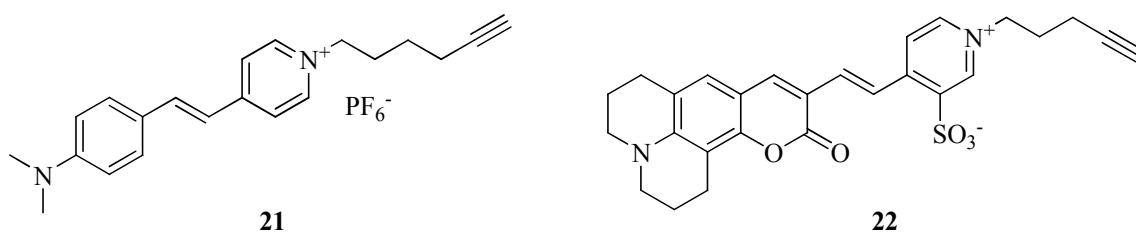
A **4** céltermékhez először a **20** amint $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on savas közegben nátrium-nitrittel diazotáltam, majd nátrium-aziddal reagáltattam, a kiváló barna csapadékot pedig leszűrve közel kvantitatív mennyiségben jutottam a tiszta 3-azido-7-dietilamino-kumarinhoz (*11. ábra*).



11. ábra. Az azido-kumarin szintézisútja.

3.4. Kapcsolódási vizsgálatok

A tirozinhoz való kapcsolódási vizsgálatokat a **2** jelölőmolekulával és a kutatócsoportban (Herner András által) készített **21** és **22**, alkin funkciós csoportjuk révén klick kapcsolásra alkalmas fluorofórokkal végeztük (12. ábra). Ez utóbbi a gyűrűbe zárt amin-csoporttól (julolidin) eltekintve úgy szerkezeti, mint spektroszkópai tulajdonságaiban nagyban hasonlít az **1** festékre, így a modellkísérletre különösen alkalmas volt.



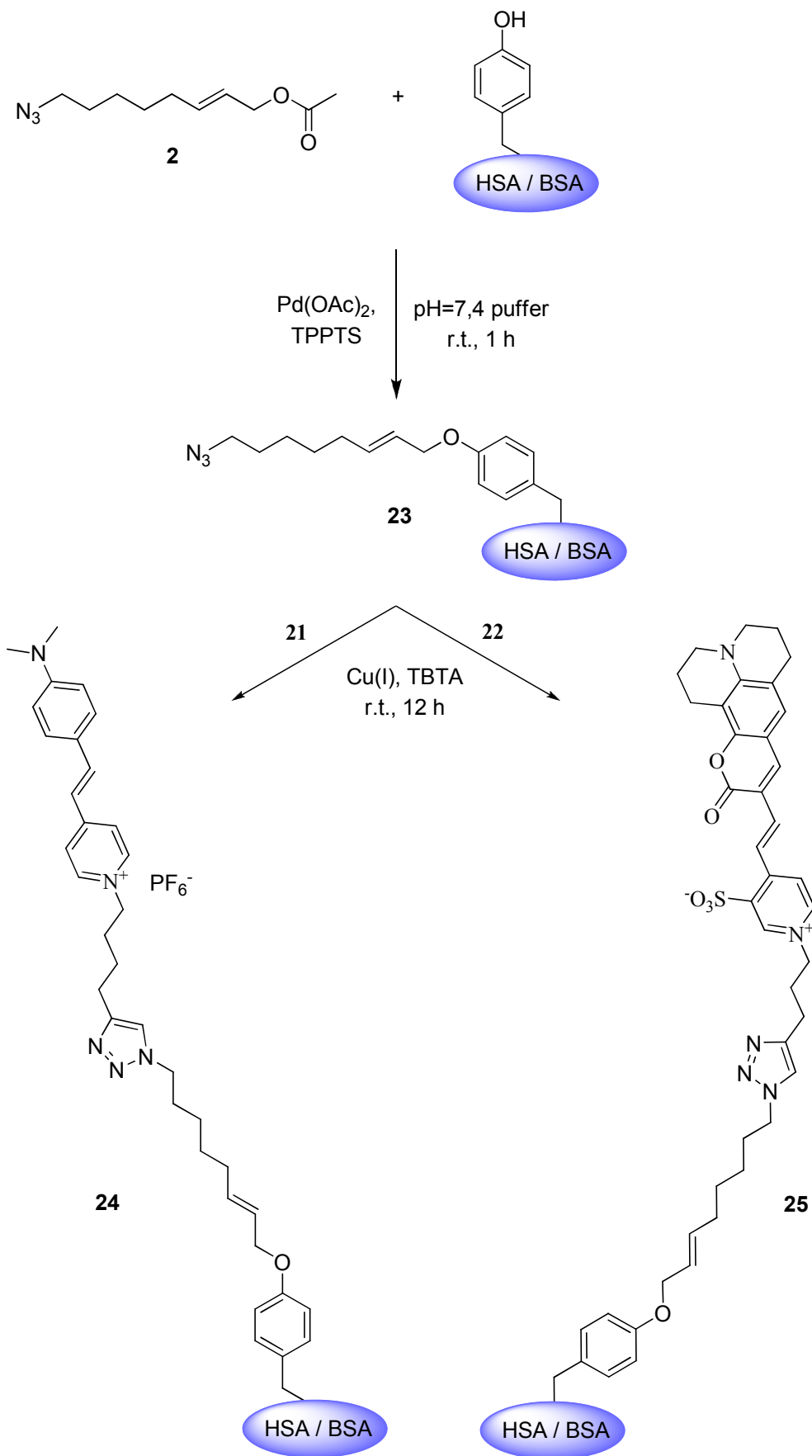
12. ábra. A szérumjelölésekhez használt fluorofórok.

Első lépésben a **2** hírvivő molekulát kapcsoltuk egyik esetben marha- (BSA), a másikban emberi szérumfehérjével (HSA) az irodalomban ismertett körülmények között [25], azaz vizes közegben, pH = 7,4 foszfát-pufferben, Pd(OAc)₂ katalizátor és a TPPTS vízoldható foszfinszármazék segítségével, szobahőmérsékleten való kevertetés mellett.

Az oldatból való izolálás nélkül a jelölt BSA-hoz a **21** festéket, míg a HSA-hoz a **22**-t kapcsoltuk a klick-reakciók során standardnak számító Cu(I) katalizátor és TBTA ligandum jelenlétében, ismételt szobahőmérsékleten való kevertetéssel (13. ábra). A tisztított **24**, illetve **25** termékekről, valamint a kiindulási festékekről fluoreszcens spektroszkópai vizsgálatok készültek (a **21** esetében oldhatósági problémák miatt metanolban, **22**, **24** és **25** esetében pedig desztillált vízben), ezeket az 1. táblázat foglalja össze.

| | 21 | 24 | 22 | 25 |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| $\lambda_{abs} / \text{nm}$ | 486 | 486 | 564 | 564 |
| λ_{em} / nm | 609 | 585 | 714 | 673 |

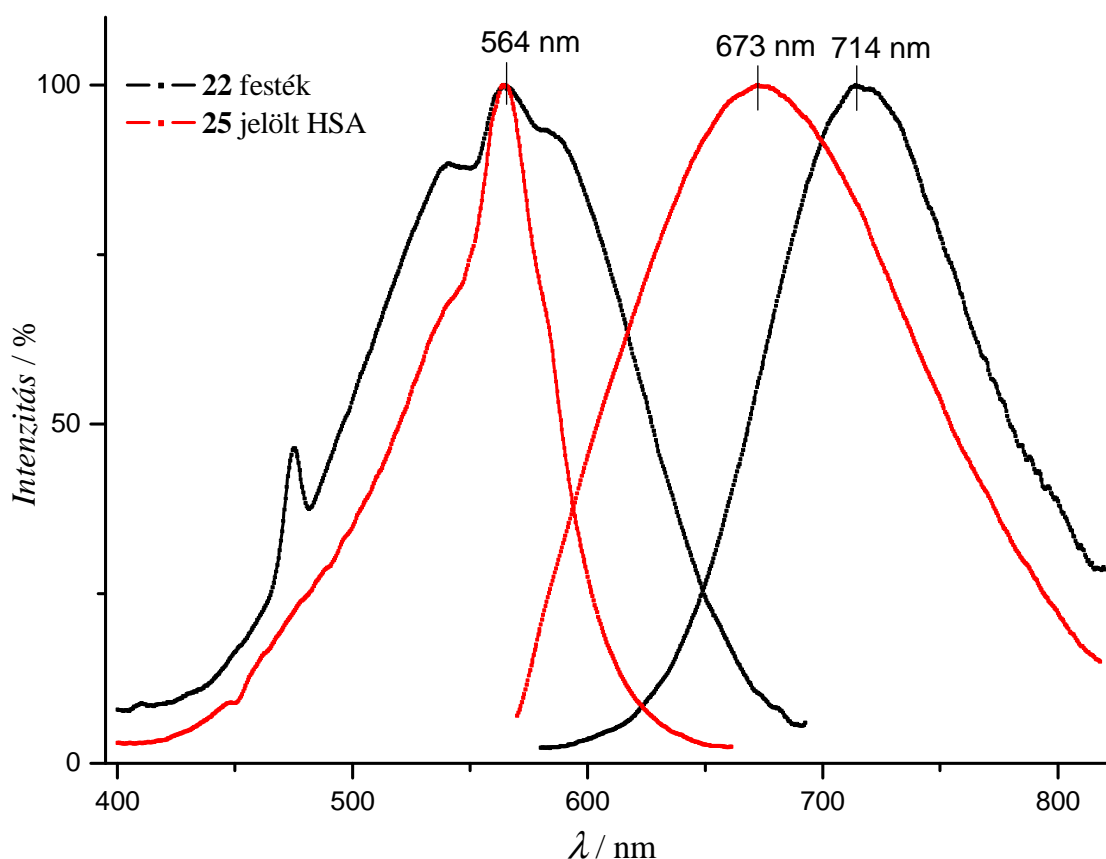
1. táblázat. Az egyes festékek és jelölt fehérjék elnyelési és emissziós maximum értékei.



13. ábra. A fehérjejelölés menete.

A fehérjéhez való kapcsolódás hatására a maximális elnyelési hullámhossz egyik esetben sem változott meg, míg az emissziós spektrumok a kisebb hullámhosszak felé tolódtak el (kékeltolódás). Ez összhangban áll azzal, hogy a közeg polaritásának megváltoztatása elsősorban – a relaxációs folyamatok miatt lassabb – emissziós spektrumot változtatja meg nagyobb mértékben. A jelentősebb változás a **22** festék esetében következett be (14. ábra). A mindkét esetben megfigyelhető kékeltolódás alapján arra lehet következtetni, hogy a fluorofór a konjugáció során apolárisabb környezetbe került. A jelölés sikerességének bizonyításához a továbbiakban gél-elektroforetikus elválasztást, illetve tömegspektrometriás méréseket tervezünk. Bár a sikeres jelölés bizonyítása további méréseket kíván, jelen eredmények biztatóak és a közeljövőben tervezzük további jelölési kísérletek elvégzését is.

A **22** festék abszorpciós és emissziós spektrumai szabadon és fehérjére kapcsolva



14. ábra. A szabad és a kötött **22** festék fluoreszcens spektrumai desztillált vízben.

4. Kísérleti rész

4.1. Általános

Az elvégzett reakciókban általában a kereskedelmi forgalomból származó reagenseket (a Sigma-Aldrich, a Merck, az Alfa Aesar vagy a Fluka cégek termékei, azokat további tisztítás nélkül használtam) és oldószereket alkalmaztam és az ettől eltérő eseteket külön feltüntettem. A száraz (absz.) oldószerek a kereskedelmi forgalomból szereztük be vagy a megfelelő szárítószerrel való desztillációval készültek és nátrium drót bevezetésével voltak tárolva.

A reakciókat vékonyréteg kromatográfiásan való követéséhez *Kieselgel 60 F₂₅₄* VRK-lapokat használtam (UV aktív, 254 nm, szilikagél, az eluenseket változatos összetételük és arányuk miatt külön feltüntettem) UV detektálással vagy kálium-permanganát előhívószer alkalmazásával. Az oszlopkromatográfiás tisztítást Merck *Silica Gel 60* szilikagélen végeztem.

A kitermelés meghatározása előtt a szilárd anyagokat mindig vákuum alatt szárítottuk tömegállandóságig, az olajok esetében pedig 10 perces részletekben addig, amíg ennyi idő alatt 1 mg-nál nagyobb tömegcsökkenés már nem következett be.

A kapott termékek szerkezetét és tisztaságát NMR spektroszkópiával igazoltuk. Az NMR mérések deuterált dimetilszulfoxidos vagy deutero-kloroformos oldatban kerültek felvételre *Bruker Avance 250 MHz*-es spektrométeren, a kémiai eltolódások (δ) pedig ppm-ben szerepelnek az adott oldószer jelét használva referenciának. A csatolási állandók (J) Hz-ben értendők. Felhasadások rövidítése: s (szingulett), d (dublett), t (triplett), qr (kvartett), qn (kvin-tett), m (multiplett), br (széles).

A ESI-HRMS méréseket az Elválasztástechnikai Kutatási és Oktatási Laboratóriumban végezték.

A spektrofotometriás vizsgálatok *Varian Eclipse* és *Jasco FP-6300* típusú spektrofluoriméterek segítségével készültek.

4.2. Vegyületek szintézise

Metil (E)-8-bróm-okt-2-enoát (6)

2,70 cm³ (30,9 mmol, 2 ekv.) oxalil-kloridot 70,0 cm³ DCM-ben feloldva -78 °C-ra hűtöttem és lassan hozzáadagoltam 2,80 cm³ (39,2 mmol, 2,5 ekv.) vízmentes DMSO 70,0 cm³ DCM-es oldatát. További hűtés közben 2,02 cm³ (15,4 mmol, 1 ekv.) 6-bróm-hexan-1-ol (5) 28,0 cm³-nyi DCM-es oldatát csepegtettem hozzá és 1 órán keresztül kevertettem -78 °C-on. A reakcióidő lejárta után hagytam szobahőmérsékletre melegedni, miközben 14,0 cm³ TEA-t adtam hozzá cseppenként, eközben az oldat opálösszé vált és kevés csapadék vált ki.

Eközben egy Erlenmeyer-lombikban feloldottam 13,00 g (31,3 mmol, 1 ekv.) (karbometoximetil)-trifenil-foszfónium bromidot 200 cm³ desztillált vízben és erős kevertetés mellett hozzáadtam 2,50 g (62,5 mmol, 2 ekv.) szilárd NaOH-ot. Az azonnal csapadékként kiváló terméket háromszor 100 cm³ DCM-el extraháltam és az egyesített szerves fázisokat egy órán át MgSO₄-on szárítottam. Szűrés és az oldószer rotációs vákuumbepárlón való eltávolítása, illetve nagyvákuumban való szárítás után a terméket 9,93 g (29,7 mmol, 95 %) fehér porként izoláltam.

Az így készült friss foszforánból az első lépésben kapott reakcióelegyhez 8,52 g-ot (25,5 mmol, 1,65 ekv.) adtam és argon légkör alatt egy éjszakán át kevertettem szobahőmérsékleten. Az időközben besárgult oldatot kétszer 50,0 cm³ 0,1 mol/dm³-es sósav-oldattal, illetve egyszer-egyszer 50,0 – 50,0 cm³ telített NaHCO₃-oldattal, desztillált vízzel és telített NaCl-oldattal mostam. A szerves fázist MgSO₄-on szárítottam, majd szűrés és az oldószer eltávolítása után kapott nyersteget oszlopkromatográfiásan tisztítottam Hex: EtOAc = 9:1 arányú elegyével. A termék halványsárga folyadék. Kitermelés: 2,78 g (78 %).

A reprodukciós lépésben 1,12 cm³ (5,5 mmol) 5-ből kiindulva 1,45 g (72 %) termékhez jutottam.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 1,47 (m, 4H); 1,81 (m, 2H); 2,21 (m, 2H); 3,39 (t, 2H, J = 6,8 Hz); 3,71 (s, 3H); 5,81 (dt, 1H, J = 1,6 Hz, 15,5 Hz); 6,94 (dt, 1H, J = 7,0 Hz, 15,5 Hz).

¹³C-NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ = 27,2; 27,6; 31,9; 32,3; 33,5; 51,4; 121,1; 149,0; 167,0.

(E)-8-bróm-okt-2-én-1-ol (7)

2,46 g (10,5 mmol, 1 ekv.) 6-ot feloldottam 35,0 cm³ DCM-ben és -78 °C-on 31,5 cm³ DIBAL-H 1 mol/dm³ THF-es oldatát (31,5 mmol, 3 ekv.) csepegtettem hozzá. További hűtés

és 1,5 órás kevertetés után hagytam szobahőmérsékletre melegedni, miközben telített NH_4Cl -oldatot adagoltam hozzá mindaddig, amíg heves gázfejlődés közben a kezdetben sötétsárga oldat elszíntelenedett. A buborékolás megszűntekor az addig folyékony reakcióelegy hirtelen gél állagúvá változott, amit további $20,0 \text{ cm}^3$ DCM-ben oldottam fel pelyhes fehér csapadék képződése közben. A kétfázisú elegyet szűrtem és elválasztás után a szerves fázist MgSO_4 -on szárítottam. Az oldószer eltávolítása után a terméket sárga olajként izoláltam, ami VRK és NMR alapján további tisztítást nem igényelt. Kitermelés: 2,02 g (93 %).

A reprodukciós lépésben 1,45 g (3,5 mmol) **6**-ból kiindulva, a reakciót végig argon légkör alatt vezetve és másfél helyett 2 órás kevertetéssel 1,25 g (98 %) termékhez jutottam.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz): $\delta = 1,43$ (m, 4H); 1,57 (brs, 1H); 1,85 (m, 2H); 2,05 (m, 2H); 3,39 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz); 4,07 (d, 2H, $J = 5,0$ Hz); 5,65 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62,5 MHz): $\delta = 27,6$; 28,3; 31,9; 32,6; 33,8; 63,6; 129,3, 132,7.

(E)-8-jód-okt-2-én-1-ol (8)

A bróm és esetlegesen klór szubsztituensek jódra cseréléshez feloldottam a **7** vegyületből 1,97 g-ot (9,5 mmol, 1 ekv.) 100 cm^3 acetonban és 4,28 g (28,5 mmol, 3 ekv.) NaI-ot adtam hozzá. A reakcióelegyet kevertetés mellett 12 óráig refluxoltattam, majd szűrést követően eltávolítottam az oldószert. A kapott nyersterméket $50,0 \text{ cm}^3$ DCM-ben feloldottam, választótölcsérben $25,0 \text{ cm}^3$ telített $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -oldattal reagáltattam, majd $20,0 - 20,0 \text{ cm}^3$ desztillált vízzel és telített NaCl-oldattal mostam. MgSO_4 -on való szárítás után a DCM-et rotációs vákuumbepárlón eltávolítva a terméket tiszta, sárga olajként kaptam meg. Kitermelés: 1,50 g (62 %).

A reprodukciós lépésben 1,09 g (5,3 mmol) **7**-ből kiindulva, 5 ekvivalens NaI felhasználásával, 16 óra refluxoltatással és 2 és fél napos szobahőmérsékleten való kevertetéssel 1,02 g (76 %) termékhez jutottam.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz): $\delta = 1,39$ (m, 4H); 1,59 (brs, 1H); 1,81 (m, 2H); 2,04 (m, 2H); 3,17 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz); 4,07 (d, 2H, $J = 4,5$ Hz); 5,64 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62,5 MHz): $\delta = 7,1$; 27,9; 29,9; 31,9; 33,3; 63,7; 129,2; 132,7. HRMS (ESI): m/z $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{IO}^+$ számított: 255,0240 $[\text{M}+\text{H}]^+$; talált: 255,0242.

(E)-8-jód-okt-2-enil acetát (9)

1,50 g (5,9 mmol, 1 ekv.) **8** 10,0 cm³ piridin:DCM = 1:1 arányú oldatához 0 °C-ra hűtést követően 1,12 cm³ (11,9 mmol, 2 ekv.) ecetsavanhidrid és 0,05 g (0,5 mmol, 0,08 ekv.) DMAP keverékét csepegtettem és 0 °C-on még 30 percet, majd egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertetem. A reakcióelegyet egy rázótolcsérben 50,0 cm³ 4 mol/dm³-es HCl-oldatra öntöttem és a terméket háromszor 20,0 cm³ dietil-éterrel extraháltam. Az egyesített szerves fázisokat 20,0 – 20,0 cm³ híg sósavval, telített NaHCO₃-oldattal, desztillált vízzel és végül telített NaCl-oldattal mostam. MgSO₄-on történő szárítás után az oldószert rotációs vákuumbepárlón eltávolítottam, így 0,81 g (46 %) tiszta terméket kaptam sötétsárga olaj formájában.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 1,40 (m, 4H); 1,79 (m, 2H); 2,05 (m, 5H); 3,17 (t, 2H, J = 7,0 Hz); 4,50 (d, 2H, J = 6,0 Hz); 5,56 (m, 1H); 5,75 (m, 1H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ = 6,9; 21,0; 26,3; 28,1; 29,9; 31,9; 65,2; 124,1; 135,9; 170,8. HRMS (ESI): m/z C₁₀H₁₈IO₂⁺ számított: 297,0346 [M+H]⁺; talált: 297,0345.

(E)-1-(8-acetoxi-okt-6-enil)-4-metilpiridínium-3-szulfonát (11)

132 mg (0,68 mmol, 2 ekv.) 4-pikolin-3-szulfonátot (**10**) melegítés segítségével feloldottam 6,6 cm³ MeCN és 3,5 cm³ DMF elegyében, 100 mg (0,34 mmol, 1 ekv.) **9**-et adtam hozzá, majd a reakcióelegyet 24 órán át refluxoltattam. Az oldószer elpárologtatása után a nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottam (eluens DCM:MeOH:TEA = 10:1:0,1). A termék viszont a várt allil-acetát csoport helyett dién láncvégződést tartalmazott.

Ezért a kísérletet megismételtem 66 mg (0,34 mmol, 1 ekv.) **10**, 100 mg (0,34 mmol, 1 ekv.) **9**, 3,3 cm³ MeCN és 2,0 cm³ DMF felhasználásával úgy, hogy feloldódás után hagytam az oldatot kihűlni és a kevertetést 40 °C-on végeztem VRK-s követés mellett (DCM:MeOH:TEA = 10:1:0,5). Ez alapján 6 óra alatt az összes kiindulási anyag elfogyott, így leállítottam a reakciót. Ekkor az oszlopkromatográfiás tisztítás (eluens DCM:MeOH:TEA = 10:1:0,1 → 10:1:0,5 gradiens) után már a kívánt terméket sikerült izolálni barnás, szilárd, kristályos anyag formájában. Kitermelés: 62 mg (53 %).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 1,40 (m, 4H); 2,03 (m, 7H); 2,91 (s, 3H); 4,47 (d, 2H, J = 6,2 Hz); 4,66 (t, 2H, J = 7,5 Hz); 5,47 (m, 1H); 5,70 (m, 1H); 7,74 (d, 1H, J = 6,2 Hz); 8,55 (dd, 1H, J = 1,4 Hz, 6,3 Hz); 9,17 (d, 1H, J = 1,3 Hz). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ = 21,0; 21,2; 25,5; 28,1; 31,2; 31,7; 61,5; 65,0; 124,5; 129,9; 135,2; 142,4; 142,5; 145,9; 158,5;

170,8. HRMS (ESI): m/z $C_{16}H_{24}NO_5S^+$ számított: 342,1370 $[M+H]^+$; talált: 342,1373. A termék 60 °C fölött bomlik.

Allil-acetát funkcionizált fluoreszcens festék (1)

10,0 cm³ EtOH-ban föloldottam 36 mg (0,15 mmol, 1 ekv.) **12** kumarin-aldehydet és 50 mg (0,15 mmol, 1 ekv.) **11**, majd 2 csepp piperidint adtam hozzá. Ekkor a reakcióelegy gyorsan pirosodni kezdett és 40 °C-os kevertetés mellett VRK (DCM:MeOH = 10/1) szerint 2 óra alatt az összes **11** kiindulási anyag elfogyott. Az oldószer bepárlását követően a nyersterméket először oszlopkromatográfiásan tisztítottam (DCM:MeOH = 20:1 → 10:1 gradien), utána pedig VRK-szilikagéles tölcserbe helyezve DCM-mel mostam (ezzel a maradék kumarint leoldottam), majd DCM:MeOH = 10:1 oldószer-eleggyel eluáltam. A termék mélylila színű kristályos anyag. Kitermelés: 27 mg (33 %).

¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz): δ = 1,14 (t, 6H, J = 6,8 Hz); 1,30 (m, 4H); 1,87 (m, 2H); 2,00 (m, 5H); 3,46 (qr, 4H, J = 6,4 Hz); 4,44 (d, 2H, J = 6,0 Hz); 4,52 (t, 2H, J = 7,0 Hz); 5,53 (m, 1H); 5,74 (m, 1H); 6,61 (s, 1H); 6,77 (d, 1H, J = 8,8 Hz); 7,59 (d, 1H, J = 8,8 Hz); 7,74 (d, 1H, J = 16,2 Hz); 8,13 (s, 1H); 8,35 (d, 1H, J = 10,2 Hz); 8,40 (s, 1H); 8,82 (d, 1H, J = 6,4 Hz); 9,08 (s, 1H). ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 62,5 MHz): δ = 12,3; 20,6; 24,9; 27,6; 30,5; 31,2; 44,3; 59,3; 64,3; 96,2; 108,3; 109,8; 114,3; 121,9; 122,4; 124,3; 130,8; 135,1; 136,1; 142,2; 142,3; 143,1; 143,7; 150,7; 151,8; 156,4; 159,5; 170,1. HRMS (ESI): m/z $C_{30}H_{37}N_2O_7S^+$ számított: 569,2316 $[M+H]^+$; talált: 569,2320. A termék 60 °C fölött bomlik.

(E)-8-azido-okt-2-én-1-ol (13)

Az azid-csoport beviteléhez 1,00 g (3,9 mmol, 1 ekv.) **8** vegyületet 50,0 cm³ acetonban oldottam és 1,28 g (19,7 mmol, 5 ekv.) NaN₃-ot adtam hozzá, majd 16 órán keresztül refluxoltattam. A reakcióidő letelte után a reakcióelegyet leszűrtem, eltávolítottam az acetont és 50,0 cm³ DCM újra feloldottam. A szervesen oldott anyag kiszűrése után az oldószert bepárolva a termék sárga olaj, ami további tisztítást nem igényelt. Kitermelés: 266 mg (40 %).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 1,38 (m, 4H); 1,58 (m, 2H); 1,71 (brs, 1H); 2,04 (m, 2H); 3,24 (t, 2H, J = 6,9 Hz); 4,06 (d, 2H, J = 3,5 Hz); 5,64 (m, 2H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ = 26,1; 28,5; 28,6; 31,9; 51,3; 63,6; 129,2; 132,6. HRMS (ESI): m/z $C_8H_{16}N_3O^+$ számított: 170,1288 $[M+H]^+$; talált: 170,1283.

(E)-8-azido-okt-2-enil-acetát (2)

255 mg (1,5 mmol, 1 ekv.) **13** 10,0 cm³ piridin:DCM = 1:1 arányú oldatához 0 °C-ra hűtést követően 290 µl (3,0 mmol, 2 ekv.) ecetsavanhidrid és 13 mg (0,1 mmol, 0,07 ekv.) DMAP 1,0 cm³ DCM-mel készült oldatát csepegtettem és 30 percig 0 °C-on, majd egy éjszakán át szobahőmérsékleten kevertetem. A reakcióelegyet egy rázótlöcsérben 25,0 cm³ 4 mol/dm³-es HCl-oldatra öntöttem és a terméket háromszor 15,0 cm³ dietil-éterrel extraháltam. Az egyesített szerves fázisokat 15,0 – 15,0 cm³ híg sósavval, telített NaHCO₃-oldattal, desztillált vízzel és végül telített NaCl-oldattal mostam. Na₂SO₄-on történő szárítás után az oldószert rotációs vákuumbepárlón eltávolítottam, így 191 mg (60 %), további tisztítást nem igénylő terméket kaptam sötétsárga olaj formájában.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 1,38 (m, 4H); 1,59 (qn, 2H, J = 6,9 Hz); 2,05 (m, 5H); 3,25 (t, 2H, J = 6,9 Hz); 4,49 (dd, 2H, J = 0,7 Hz, 6,3 Hz); 5,55 (m, 1H); 5,75 (m, 1H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ = 21,0; 26,1; 28,3; 28,6; 32,0; 51,3; 65,2; 124,1; 135,9; 170,8. HRMS (ESI): m/z C₁₀H₁₈N₃O₂⁺ számított: 212,1394 [M+H]⁺; talált: 212,1392.

Metil (E)-oct-2-én-7-inoát (15)

805 µl (9,0 mmol, 2 ekv.) oxalil-kloridot 21,0 cm³ DCM-ben feloldva -78 °C-ra hűtöttem és lassan hozzáadagoltam 825 µl (11,6 mmol, 2,5 ekv.) vízmentes DMSO 20,5 cm³ DCM-mes oldatát. További hűtés közben 500 µl (4,6 mmol, 1 ekv.) 6-bróm-hexan-1-ol (**5**) 8,0 cm³-nyi DCM-es oldatát csepegtettem hozzá és 1,5 órán keresztül kevertetem -78 °C-on. A reakcióidő lejártá után hagytam szobahőmérsékletre melegedni, miközben 4,2 cm³ TEA-t adtam hozzá cseppenként, eközben az oldat opálösszé vált és kevés csapadék vált ki.

Eközben egy Erlenmeyer-lombikban feloldottam 3,95 g (9 mmol, 1 ekv.) (karbometoximetil)-trifenil-foszfónium bromidot 50 cm³ desztillált vízben és erős kevertetés mellett hozzáadtam 0,76 g (19 mmol, 2 ekv.) szilárd NaOH-ot. Az azonnal csapadékként kiváló terméket háromszor 50,0 cm³ DCM-el extraháltam és az egyesített szerves fázisokat egy órán át MgSO₄-on szárítottam. Szűrés és az oldószer rotációs vákuumbepárlón való eltávolítása, illetve nagyvákuumban való szárítás után a terméket 2,92 g (9 mmol, 92 %) fehér porként izoláltam.

Az így készült friss foszforánból az első lépésben kapott reakcióelegyhez 2,54 g-ot (7,6 mmol, 1,65 ekv.) adtam és argon légkör alatt egy éjszakán át kevertetem

szobahőmérsékleten. A narancssárga oldatot kétszer 30,0 cm³ 0,1 mol/dm³-es sósavoldattal, illetve egyszer-egyszer 30,0 – 30,0 cm³ telített NaHCO₃-oldattal, desztillált vízzel és telített NaCl-oldattal mostam. A szerves fázist Na₂SO₄-on szárítottam, majd szűrés és az oldószer eltávolítása után kapott nyersterméket oszlopkromatográfiásan tisztítottam Hex:EtOAc = 10:1 arányú elegyével. A termék halványsárga folyadék. Kitermelés: 644 mg (92 %).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 1,70 (qn, 2H, J = 7,5 Hz); 1,99 (t, 1H, J = 2,6 Hz); 2,23 (td, 2H, J = 2,6 Hz, 7,0 Hz); 2,34 (qnd, 2H, J = 1,4 Hz, 7,1 Hz); 3,73 (s, 3H); 5,87 (dt, 1H, J = 1,4 Hz, 15,5 Hz); 6,96 (dt, 1H, J = 7,0 Hz, 15,5 Hz). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ = 27,2; 27,6; 31,9; 32,3; 33,5; 51,4; 121,1; 149,0; 167,0. HRMS (ESI): m/z C₉H₁₃O₂⁺ számított: 153,0910 [M+H]⁺; talált: a mérés folyamatban van.

(E)-okt-2-én-7-in-1-ol (16)

620 mg (4,1 mmol, 1 ekv.) **6**-ot feloldottam 13,5 cm³ DCM-ben és -78 °C-on 12,5 cm³ DIBAL-H 1 mol/dm³ THF-es oldatát (12,5 mmol, 3 ekv.) csepegtettem hozzá. További hűtés és 1,5 órás kevertetés után hagytam szobahőmérsékletre melegedni, miközben telített NH₄Cl-oldatot adagoltam hozzá mindaddig, amíg heves gázfejlődés közben a kezdetben sárga oldat elszíntelenedett. A buborékolás megszűntekor az addig folyékony reakcióelegy azonnal gél állagúvá változott, amit további 10,0 cm³ DCM-ben oldottam fel pelyhes fehér csapadék képződése közben. Az elegyet leszűrtem és a szűrletet 5,0 cm³ desztillált víz hozzáadása után rázóüvegsérben elválasztottam. A szerves fázist Na₂SO₄-on szárítottam, majd az oldószer eltávolítása után a terméket sárga olajként izoláltam, amiből a célterméket a megmaradt kiindulási anyagtól oszlopkromatográfia (eluens Hex:EtOAc = 9:1) segítségével választottam el. Kitermelés: 175 mg (35 %).

Megjegyzés: az alacsony kitermelés okát keresve jöttünk rá, hogy a felhasznált DIBAL-H oldat az állás során felhígult (a levegővel érintkezve lassan elreagált), így valójában nem került 3 ekvivalensnyi belőle a reakcióelegybe. Ezt kiküszöbölve valószínűleg az előzőekhez hasonló kitermelést lehetne itt is elérni.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 1,62 (qn, 2H, J = 7,3 Hz); 1,88 (brs, 1H); 1,97 (t, 1H, J = 2,6 Hz); 2,18 (m, 2H); 4,09 (d, 2H, J = 2,2 Hz); 5,76 (m, 2H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ = 17,7; 27,7; 31,0; 63,4; 68,5; 84,1; 129,8; 131,7. HRMS (ESI): m/z C₈H₁₃O⁺ számított: 125,0961 [M+H]⁺; talált: a mérés folyamatban van.

(E)-okt-2-én-7-inil-acetát (3)

175 mg (1,4 mmol, 1 ekv.) **16** 10,0 cm³ piridin:DCM = 1:1 arányú oldatához 0 °C-ra hűtést követően 270 µl (2,9 mmol, 2 ekv.) ecetsavanhidrid és 12 mg (0,9 mmol, 0,07 ekv.) DMAP 1,0 cm³ DCM-mel készült oldatát csepegtettem és 30 percig 0 °C-on, majd 16 órán át szobahőmérsékleten kevertetem. A reakcióelegyet egy rázótolcsérben 24,0 cm³ 4 mol/dm³-es HCl-oldatra öntöttem és a terméket háromszor 15,0 cm³ dietil-éterrel extraháltam. Az egyesített szerves fázisokat 10,0 – 10,0 cm³ híg sósavval, telített NaHCO₃-oldattal, desztillált vízzel és végül telített NaCl-oldattal mostam. Na₂SO₄-on történő szárítás után az oldószert rotációs vákuumbepárlón eltávolítottam, így 187 mg (80 %), további tisztítást nem igénylő terméket kaptam sötétsárga olaj formájában.

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 1,63 (qn, 2H, J = 7,5 Hz); 1,96 (t, 1H, J = 2,6 Hz); 2,07 (s, 3H); 2,19 (m, 4H); 4,51 (d, 2H, J = 5,5 Hz); 5,68 (m, 2H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ = 17,7; 21,0; 27,5; 31,0; 65,1; 68,6; 84,0; 124,7; 139,0; 170,8. HRMS (ESI): m/z C₁₀H₁₅O₂⁺ számított: 167,1067 [M+H]⁺; talált: a mérés folyamatban van.

7-dietilamino-3-nitro-kumarin (19)

3,00 g 4-dietilamino-szalicilaldehydet (**17**) (15,5 mmol, 1 ekv.) és 2,40 g (1,85 cm³, 18,0 mmol, 1,16 ekv.) etil-nitroacetátot (**18**) feloldottam 40,0 cm³ etanolban, majd reflux hőmérsékleten kevertetem és VRK-san (Hex:EtOAc = 1:1) követtem a reakciót. Ezek alapján 3 óra alatt az összes kiindulási anyag elfogyott és csapadékként kivált a termék. Szűrés és hideg etanolos mosás után a terméket narancssárga porként izoláltam, ami további tisztítást nem igényelt. Kitermelés: 2,78 g (68 %).

¹H-NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ = 1,26 (t, 6H, J = 7,2 Hz); 3,49 (qn, 4H, J = 7,2 Hz); 6,46 (d, 1H, J = 2,2 Hz); 6,70 (dd, 1H, J = 2,4 Hz, 9,1 Hz); 7,43 (d, 1H, J = 9,1 Hz); 8,69 (s, 1H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ = 12,4; 45,5; 96,7; 106,1; 111,1; 132,5; 143,3; 153,4; 154,6; 158,7; (a nitrocsoporthoz kapcsolódó szén jele nem jelent meg).

3-amino-7-dietilamino-kumarin (20)

Feloldottam 12,80 g (56,7 mmol, 7,4 ekv.) $\text{SnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ -ot 26,7 cm^3 cc. HCl-oldatban, majd folyamatos kevertetés mellett lassan hozzáadagoltam 2,00 g (7,6 mmol, 1 ekv.) **19** nitro-kumarint. A reakcióelegyet 3 óráig szobahőmérsékleten kevertettem, majd 66,0 g jégre öntöttem és pH-ját 5 mol/dm^3 -es NaOH-oldattal 9-re állítottam be. A terméket háromszor 60,0 cm^3 dietil-éterrel extraháltam, az egyesített szerves fázist pedig kétszer 50,0 cm^3 desztillált vízzel és egyszer 50,0 cm^3 telített NaCl-oldattal mostam, végül Na_2SO_4 -on szárítottam. Szűrés után az oldószert rotációs vákuumbepárló segítségével eltávolítottam és a visszamaradó barnás olajat kevés hexánnal eldörzsöltem. A kiváló kristályokról a hexánt vákuumon eltávolítottam, az így kapott termék tiszta, sötétsárga kristályos anyag. Kitermelés: 1,20 g (68%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz): $\delta = 1,18$ (t, 6H, $J = 7,0$ Hz); 3,37 (qn, 4H, $J = 7,0$ Hz); 3,86 (brs, 2H); 6,52 (s, 1H); 6,56 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz); 6,70 (s, 1H); 7,10 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62,5 MHz): $\delta = 12,5$; 44,6; 98,0; 109,3; 109,6; 114,4; 125,9; 127,7; 147,5; 151,6; 160,3.

3-azido-7-dietilamino-kumarin (4)

1,00 g (4,3 mmol, 1 ekv.) **20**-at feloldottam 35,0 cm^3 20 %-os sósavoldatban, 0 °C-on kevertetés közben lassan hozzáadagoltam 0,32 g (4,5 mmol, 1,05 ekv.) NaNO_2 -t, majd folyamatos hűtés közben egy órán át kevertettem. Ezután pH-ját 25 %-os nátrium-acetát-oldat segítségével 4-re állítottam be és kis adagokban 0,28 g (4,3 mmol, 1 ekv.) NaN_3 -ot adtam hozzá. 0 °C-on további 5 órán át kevertettem, majd a reakcióidő lejárta után a kiváló csapadékot szűrtem, hideg vízzel mostam és exsikkátorban szárítottam. A termék barna színű kristályos szilárd anyag. Kitermelés: 1,07 g (96 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz): $\delta = 1,26$ (t, 6H, $J = 7,2$ Hz); 3,47 (qn, 4H, $J = 7,2$ Hz); 6,50 (s, 1H); 6,69 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); 7,10 (s, 1H); 7,21 (d, 1H, $J = 9,1$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62,5 MHz): $\delta = 12,5$; 44,7; 98,0; 109,6; 112,4; 117,2; 126,0; 142,4; 147,5; 151,1; 157,8.

Fehérjejelölés menete

Összekevertünk

- 100,0 μL 1,00 mM-os fehérje-oldatot (vizes, 1 ekv.),
- 27,15 μL 18,41 mM-os **2**-oldatot (DMSO-s, 5 ekv.),
- 2,80 μL 7,14 mM-os Pd-katalizátor oldatot (vizes, 0,2 ekv., készítése: [26]) és
- 370,0 μL pH=7,4 foszfát-puffert,

majd a reakcióelegy 1 óra szobahőmérsékletű kevertetése után hozzáadtunk

- 123,0 μL 4,08 mM-os **21**-, illetve **22**-oldatot (DMSO-s, 5 ekv.),
- 47,60 μL 0,525 mM-os CuI-oldatot (vizes, 0,25 ekv., a festékhez képest 5%) és
- 47,60 μL 1,575 mM-os TBTA-oldatot (vizes, 0,75 ekv.).

A reakcióelegyet egy éjszakán át való kevertetése után Sephadex G-25 jelölésű gélen szűrtük, a célterméket mindkét esetben az első (színes) frakció tartalmazta.

5. Összefoglalás

Biopolimerek *in vivo* fluoreszcens jelölésére és nyomon követésére a leghatékonyabb módszerek a bioortogonális ligáción alapuló eljárások. A jelenleg ismert bioortogonális reakciók közül a legelterjedtebbek és sebességüket figyelembe véve az egyik leggyorsabbnak tekinthetők az úgynevezett Cu(I) katalizált alkin-azid 1,3 dipoláris cikloaddíció. A bioortogonális ligációk fontos feltétele, hogy a jelzővegyületek csak a célvegyület megfelelő funkciós csoportjával reagáljanak. Tekintve, hogy a természetes vegyületekben számos funkciós csoport található, célszerű az érdeklődésünk központjában álló biovegyületet előzőleg olyan mesterséges vegyülettel, kémiai hírvivővel módosítani, ami a természetben ritkán előforduló funkciós csoportot tartalmaz, amely a továbbiakban szelektíven módosítható a jelzővegyülettel. A költségek és a lehetőségek tekintetében érthető, hogy a peptid- és fehérjekutatásokban az egyes aminosavakra specifikus, azaz csak a célzott oldallánccal reagáló funkciós csoportokkal ellátott jelölőmolekulákra való igény az utóbbi években egyre nő.

Munkám során tirozin-specifikus módosítást lehetővé tevő kémiai hírvivők szintézisét valósítottam meg. Munkám eredményeként előállítottam egy Tyr-specifikus motívumot tartalmazó mega-Stokes fluorofórt (**1**), ezt követően pedig olyan bifunkciós kémiai hírvivőket szintetizáltam, melyek a Tyr-specifikus funkció mellett azid (**2**), illetve alkin csoportot (**3**) tartalmaztak. Ezen kémiai hírvivővegyületek a tirozin módosítást követően a továbbiakban CuAAC reakcióval fluoreszcens jelzővegyülettel kapcsolhatóak.

Kísérleteink rámutattak arra, hogy azid/alkin típusú fluoreszcens jelzővegyületek az előzetesen kémiai hírvivővel módosított fehérjékre köthetőek. Az ígéretes eredmények alapján további tesztek tervezünk megvalósítani, melyek során monomerek és kisebb peptidek segítségével szelektivitási, sejtjelölési és sejtbejutási vizsgálatokhoz kívánjuk őket felhasználni.

Távlati terveim között szerepel olyan új fluoreszcens jelzővegyületek és hírvivő molekulák kifejlesztése, valamint vizsgálata, melyek segítségével eddig nem megfelelően szelektív, vagy hatékony módszerrel jelölhető aminosavak (például a cisztein, a hisztidin vagy a triptofán) fluoreszcens jelzése is elérhetővé válhat.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet nyilvánítani témavezetőmnek, **Dr. Kele Péter**nek a mindenre kiterjedő segítségéért, rengeteg szakmai és gyakorlati tanácsáért, **Herner András**nak a laboratóriumi munka terén nyújtott tanácsaiért és a fehérjejelésben nyújtott pótolhatatlan segítségéért, továbbá a csoport összes többi tagjának – **Lőrincz Krisztián**nak, **Nagy Krisztinán**ak és **Varga Balázs Róbert**nek – a támogatásukért, segítségükért, biztatásukért és lelkesítésükért.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Kurpiers, T.; Mootz, H. D. „Bioorthogonal Ligation in the Spotlight”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 1729-1732.
- [2] Song, W.; Wang, Y.; Qu, J.; Madden, M. M.; Lin, Q. „A Photoinducible 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction for Rapid, Selective Modification of Tetrazole-Containing Proteins”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2832-2835.
- [3] Song, W.; Wang, Y.; Qu, J.; Lin, Q. „Selective Functionalization of a Genetically Encoded Alkene-Containing Protein via “Photoclick Chemistry” in Bacterial Cells”, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 9654-9655.
- [4] Wang, J.; Zhang, W., Song, W.; Wang, Y.; Yu, Z.; Li, J.; Wu, M.; Wang, L.; Zang, J.; Lin, Q. „A Biosynthetic Route to Photoclick Chemistry on Proteins”, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 14812-14818.
- [5] Saxon, E.; Bertozzi, C. R. „Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction”, *Science*, **2007**, *287*, 2007-2010.
- [6] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. „Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004-2021.
- [7] Huisgen, R. „Centenary Lecture – 1,3-Dipolar Cycloadditions”, London, **1960**
- [8] Rostovtsev, V. V., Green, L. G.; Fokin, V. V., Sharpless K. B. „A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596-2599.
- [9] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. „Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides”, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057-3064.
- [10] Kele, P.; Li, X.; Link, M.; Nagy, K.; Herner, A.; Lőrincz, K.; Béni, Sz.; Wolfbeis, O. S. „Clickable fluorophores for biological labeling – with or without copper”, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3486-3490.

- [11] Nagy, K.; Orbán, E.; Bósze, Sz.; Kele, P. „Clickable long-wave "megaStokes" fluorophores for orthogonal chemoselective labeling of cells”, *Chem. Asian J.*, **2010**, *5*, 773-777.
- [12] Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. „Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 16793-16797.
- [13] Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. „Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology”, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 1272-1279.
- [14] Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. „Readily Accessible Bicyclononynes for Bioorthogonal Labeling and Three-Dimensional Imaging of Living Cells”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1-5.
- [15] Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. „Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 2253-2255.
- [16] Hantzsch, A.; Lehmann, M.; „Über Bisazoxyessigsäure, Bisazoxymethan und Hydraziessigsäure”, *Chem. Ber.*, **1900**, *33*, 3668-3685
- [17] Tai, C. J.; Yang, L.; Allinger, N. L. „Molecular mechanics (MM3). Calculations on nitrogen-containing aromatic heterocycles”, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 11906.
- [18] Carbon, R. A.; Lindsey, R. V. „Reactions of Tetrazines with Unsaturated Compounds. A New Synthesis of Pyridazines”, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 4342-4346.
- [19] Sauer, J.; Heinrichs, G. „Kinetik und umsetzungen von 1.2.4.5-tetrazinen mit winkelgespannten und elektronenreichen doppelbindungen”, *Tetrahedron Lett.*, **1966**, *41*, 4979-4984.
- [20] Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. „Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging”, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 2297-2299.

- [21] Li, Z.; Cai, H.; Hassink, M.; Blackman, M. L.; Brown, R. C. D.; Conti, P. S.; Fox, J. M. „Tetrazine – trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of ^{18}F labeled probes”, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 8043-8045.
- [22] Lakowicz, J.R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy Adsorption*, Springer, Singapore, 443-468 (2006).
- [23] Sletten, J. M.; Bertozzi, C. R. „Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality”, *Ang. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 6974-6998.
- [24] Morales-Sanfrutos, J.; Lopez-Jaramillo, J.; Ortega-Munoz, M.; Megia-Fernandez, A.; Perez-Balderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. „Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization”, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 667-675.
- [25] Kele, P.; Mező, G.; Achatz, D.; Wolfbeis, O. S. „Dual labeling of biomolecules by using click chemistry: A sequential approach.”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 344-347.
- Achatz, D. E. A.; Mező, G.; Kele, P.; Wolfbeis, O. S. „Probing the activity of matrix metalloproteinase II using a sequentially clicked-labeled silica nanoparticle FRET probe.”, *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 2316-2320.
- [26] Tilley, S. D.; Francis, M. B. „Tyrosine-Selective Protein Alkylation Using π -Allylpalladium Complexes”, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 1080-1081.
- [27] Takahashi, K.; Miyake, A.; Hata, G. „Palladium-catalysed exchange of allylic groups of ethers and esters with active-hydrogen compounds”, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1970**, 1392-1393.
- [28] Satoh, T.; Ikeda, M.; Miura, M.; Nomura, M. „Palladium-Catalyzed Etherification of Allyl Alcohols Using Phenols in the Presence of Titanium(IV) Isopropoxide”, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 4877-4879.
- [29] Trost, B. M.; Toste, F. D. „Asymmetric O- and C-Alkylation of Phenols”, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 815-816.

- [30] Chen, S.; Li, X.; Ma, H. „New Approach for Local Structure Analysis of the Tyrosine Domain in Proteins by Using a Site-Specific and Polarity-Sensitive Fluorescent Probe”, *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 1200-1207.
- [31] Li, X.; Ma, H.; Dong, S.; Duan, X.; Liang, S. „Selective labeling of histidine by a designed fluorescein-based probe”, *Talanta*, **2004**, *62*, 367-371.
- [32] Shivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. K. „A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes”, *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 4603-4606.