

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

**Proteiinien fluoresenssimikroskopiassa käytettävät
merkkiaineet**

Kandidaatintutkielma

ja tutkimusprojekti

20.6.2018

Antti Leppänen



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Tiivistelmä

Kirjallisessa osassa käydään läpi fluoresenssin ja fluoresenssimikroskopian perusteet sekä joitakin tunnetuimpia fluoresoivia väriaineita ja niiden johdannaisia. Kirjallisen osan loppupäässä perehdytään erilaisiin fluoresoiviin merkkiaineisiin ja menetelmiin, joita käytetään proteiinien kuvantamisessa fluoresenssimikroskopian avulla.

Kokeellisessa osassa valmistettiin koolihapon ja kahden fluoresoivan pyreenijohdannaisen konjugaatit: koolihapon *N*-metyylipyreeniamidi ja koolihapon metyylipyreeniesteri. Valmistettuja johdannaisia voidaan mahdollisesti käyttää kolesterolin merkkiaineena tulevissa tutkimuksissa.

Esipuhe

Kirjallisen lähdemateriaalin hakemiseen käytettiin pääosin Google Scholar-hakukonetta, ja hakeminen aloitettiin hakusanoilla *fluorescence microscopy*, *fluorescent probes* ja *imaging proteins with fluorescent probes*. Lisäksi käytettiin hyväksi kokooma-artikkelien viitetietoja sekä aihealueeseen liittyviä oppikirjoja.

Tutkielman kirjallisen ja kokeellisen osan ohjaajana toimi yliopistonlehtori, dosentti Elina Sievänen, jota haluan kiittää sekä mielenkiintoisen aiheen ja kokeellisen osan tarjoamisesta, että tiiviistä tuesta ja avusta koko opinnäytetyön aikana.

Haluan myös kiittää Jyväskylän yliopistoa ja kemian laitosta sekä sen henkilökuntaa laadukkaasta ja mielenkiintoisesta opetuksesta.

Lisäksi haluan kiittää minua varhaisemmissa vaiheissa ohjanneita ja inspiroineita opettajia sekä minua opintojen ja elämän eri vaiheissa kannustaneita ja tukeneita läheisiä.

SISÄLLYSLUETTELO

| | |
|--------------------------------------------|-----|
| TIIVISTELMÄ | i |
| ESIPUHE | ii |
| SISÄLLYSLUETTELO | iii |
| KÄYTETYT LYHENTEET JA VIERASPERÄISET SANAT | iv |

KIRJALLINEN OSA

| | |
|------------------------------------------------------------------|----|
| 1 JOHDANTO | 1 |
| 2 LUMINESENSSI | 2 |
| 2.1 FLUORESENSSIMIKROSKOOPPI | 5 |
| 3 FLUORESENSSIMIKROSKOPIAN HYÖDYNTÄMINEN SOLUBIOLOGIASSA | 7 |
| 3.1 FLUORESOIVAT VÄRIAINHEET | 7 |
| 4 PROTEIINIEN FLUORESENSSIMIKROSKOPIASTA | 12 |
| 4.1 VÄRIAIKNEEN LIITTÄMINEN SUORAAN TUTKITTAVAAN PROTEIINIIN | 12 |
| 4.2 VÄRIAIKNEEN LIITTÄMINEN PROTEIINIIN TUNNISTAVAAN MOLEKYYLIIN | 16 |
| 5 YHTEENVETO | 20 |

KOKEELLINEN OSA

| | |
|----------------------------------------------|----|
| 6 TYÖN TARKOITUS | 22 |
| 7 MENETELMÄT, LAITTEET JA KÄYTETYT REAGENSIT | 22 |
| 8 SYNTEESIT | 23 |
| 9 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU | 26 |
| 10 YHTEENVETO | 28 |
| 11 SYNTEESIOHJEET | 29 |
| 12 VALMISTETUT MOLEKYYLIT | 30 |
| 13 KIRJALLISUUSLUETTELO | 31 |
| LIITTEET | 34 |

Käytetyt lyhenteet ja vierasperäiset sanat

| | |
|-------------------|------------------------------------------|
| DMF | Dimetyyliformamidi |
| DCM | Dikloorimetaani |
| GFP | Green fluorescent protein |
| <i>in vitro</i> | Koejärjestely elottomassa ympäristössä |
| <i>in vivo</i> | Koejärjestely elollisessa ympäristössä |
| MeOH | Metanoli |
| NMR-spektroskopia | Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia |

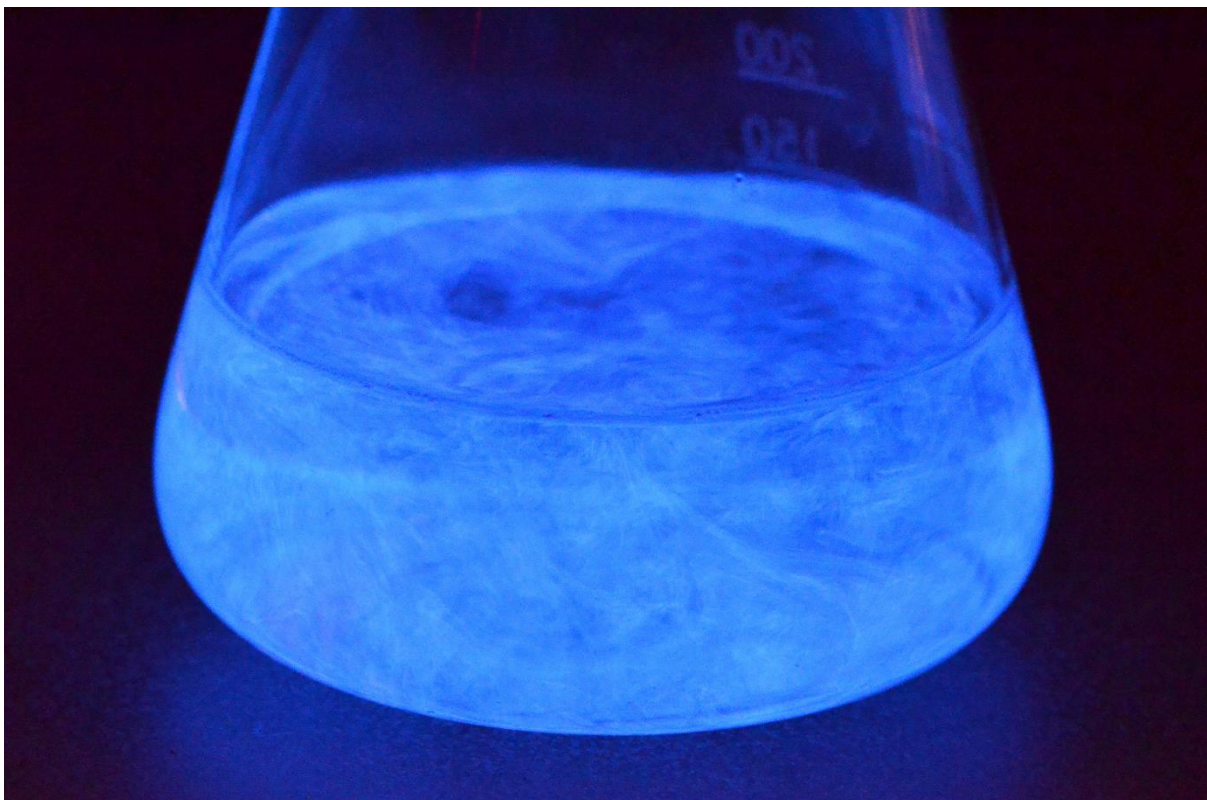
1 Johdanto

Tämän tutkielman kirjallisessa osassa perehdytään aluksi fluoresenssin ja fluoresenssimikroskopian perusteisiin sekä tarkastellaan muutamia fluoresoivia väriaineita ja niiden sovelluksia. Kirjallisen osan lopussa käydään läpi fluoresenssimikroskopiassa proteiinien kuvantamisessa käytettyjä väriaineita ja menetelmiä sekä esimerkkejä tutkimuksista ja sovelluksista, joissa niitä on käytetty. Fluoresenssimikroskopia on äärimmäisen tärkeä ja hyödyllinen työkalu solubiologisessa tutkimuksessa, ja sen avulla saadaan jatkuvasti tärkeää tietoa biologisista vuorovaikutuksista ja toiminnoista solussa ja sen ulkopuolella.

Kokeellisessa osassa valmistettiin koolihapon ja kahden fluoresoivan pyreenijohdannaisen konjugaatit: koolihapon *N*-metyylipyreeniamidi ja koolihapon metyyliipyreeniesteri. Molempia johdannaisia valmistettaessa koolihapon annettiin ensin reagoida etyyliklooriformiaatin kanssa, jolloin muodostui aktiivinen anhydridiväliaine. Anhydridin annettiin reagoida aminometyylipyreenin tai 1-pyreenimetanolin kanssa, minkä seurauksena saatiin halutut lopputuotteet. Sen jälkeen raakatuotteet puhdistettiin pylväskromatografisesti. Lopuksi koolihapon *N*-metyylipyreeniamidi puhdistettiin kiteyttämällä se kloroformista ja koolihapon metyyliipyreeniesteri uudelleenkiteyttämällä se asetonitriilistä. Valmistetuista ja puhdistetuista tuotteista mitattiin ^1H ja ^{13}C NMR-spektrit sekä massaspektit. Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidista mitattiin lisäksi absorptiospektri UV-Vis-spektrofotometrillä ja emissiospektrit fluoresenssispektrofotometrillä käyttäen viritysaallonpituuksina 234 ja 343 nm. Absorptio- ja emissiomittausten perusteella koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin todettiin käyttäytyvän fluoresoivien ominaisuuksiensa osalta vastaavalla tavalla kuin pyreeni. Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin todettiin soveltuvan ainakin fluoresoivien ominaisuuksiensa perusteella jatkotutkimuksiin. Molempien tuotteiden soveltuvuutta kolesterolin merkkiaineiksi on tarkoitus tutkia jatkossa.

2 Luminesenssi

Luminoidessaan aine emittoi valoa tietynlaisen elektronisen viritystilan purkautuessa. Purkautuvan viritystilan luonteen perusteella luminesenssi voidaan jakaa fluoresenssiin ja fosforesenssiin.¹ Luminesenssin alle mahtuu runsas kirjo mielenkiintoisia ilmiötä, joita hyödynnetään laajalti teollisuuden, tieteen ja arkielämän sovelluksissa. Luminesenssia voi ilmetä tapauskohtaisesti monista eri syistä kuten esimerkiksi sähkön, kitkan tai biologisen reaktion seurauksena.² Esimerkkejä käytännön sovelluksista ovat muun muassa sähkövirran avulla tuotettu luminesenssi lampuissa ja LED-näytöissä³ sekä viihteen ja taiteen parissa käytetyt valotikut⁴ ja hohtavat maalit⁵. Kuvassa 1 on kemiallisen reaktion seurauksena hohtavaa luminolia, jota voidaan käyttää esimerkiksi merkkiaineena verelle rikospaikkatutkimuksessa. Veren sisältämä rauta katalysoi luminolin ja vetyperoksidin reaktiota tuottaen voimakkaan kemiluminesenssin.⁶



Kuva 1. Kuva luminolin tuottamasta kemiluminesenssista.⁷

Fluoresenssi

Fluoresenssia ilmenee, kun molekyyli säteilee eli emittoi valoa viritystilan purkautuessa niin kutsutulta singlettitalta. Tämä valo voidaan havaita mittauslaitteella tai jopa paljaalla silmällä, jos säteilevä valo on sopivalla aallonpituusalueella n. 350-700 nm. Jotta fluoresenssia voi ilmetä, molekyylin on ensin absorboitava energiaa ja virityttävä. Viritys voidaan saada aikaan kohdistamalla molekyyliin säteilyä sellaisella aallonpituudella, jonka se voi absorboida siten, että molekyyliin tapahtuu elektronin virittyminen perustilalta korkeammille viritystiloille. Kun elektronin viritystila purkautuu ja se palaa takaisin perustilalle, se voi emittoida virityksessä absorboidun ”ylimääräisen” energian pois fotonina eli valona ympäristöön.^{1,8,9}

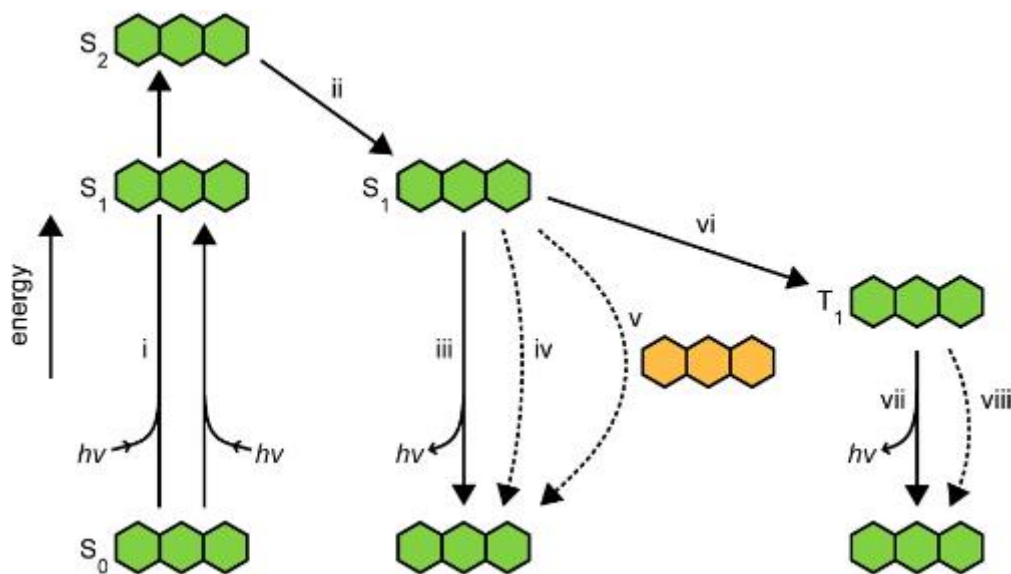
Molekyyli ei kuitenkaan säteile valoa takaisin samalla aallonpituudella, jolla se on valoa absorboinut, vaan yleensä matalaenergisemmällä ja pidemmällä aallonpituuksilla. Tätä siirtymää absorption ja emission aallonpituuksien välillä kutsutaan Stokesin siirtymäksi. Molekyylin emittoima foton sisältää vähemmän energiaa, koska absorptiossa virittynyt molekyyli ehtii luovuttamaan osan energiastaan säteilemättömästi ennen kuin se siirtyy alimmalta viritystilalta perustilalle fluoresoivasti. Virittynyt molekyyli voi esimerkiksi luovuttaa osan ylimääräisestä energiastaan ympäröivien molekyylien vibraatioon ja rotaatioon. Käytännössä tämä merkitsee sitä, että osa virittyneen molekyylin energiasta välittyy lämmöksi ympäristöön.^{1,8,9}

Relaksaatio on käsite, jolla kuvataan virittyneen molekyylin ja sitä ympäröivien liuotinmolekyylien energeettisen potentiaalieron tasoittumista. Relaksaatiota tapahtuu virittyneen molekyylin ja sitä ympäröivien molekyylien välillä heti sen jälkeen, kun molekyyli virittyy ja myös sen jälkeen, kun virittynyt molekyyli on luovuttanut energiaa säteilemällä. Relaksaatiossa on kyse ympäröivien molekyylien mukautumisesta virittyvän molekyylin muuttuviin energeettisiin tiloihin.⁸

Molekyylin emittoima säteily on siis yleensä matalaenergisempää kuin sen absorboima valo, ja siksi molekyylin emittoima valo on aallonpituudeltaan pidempää kuin absorboidun valon aallonpituus. Jokaisella molekyyllillä on sille ominaiset eli karakteristiset aallonpituudet, joita se absorboi ja aallonpituudet, joita se emittoi. Myös viritettäviä molekyyliä ympäröivät molekyylit vaikuttavat emissioon relaksaation kautta.^{1,8,9}

Fosforesenssi

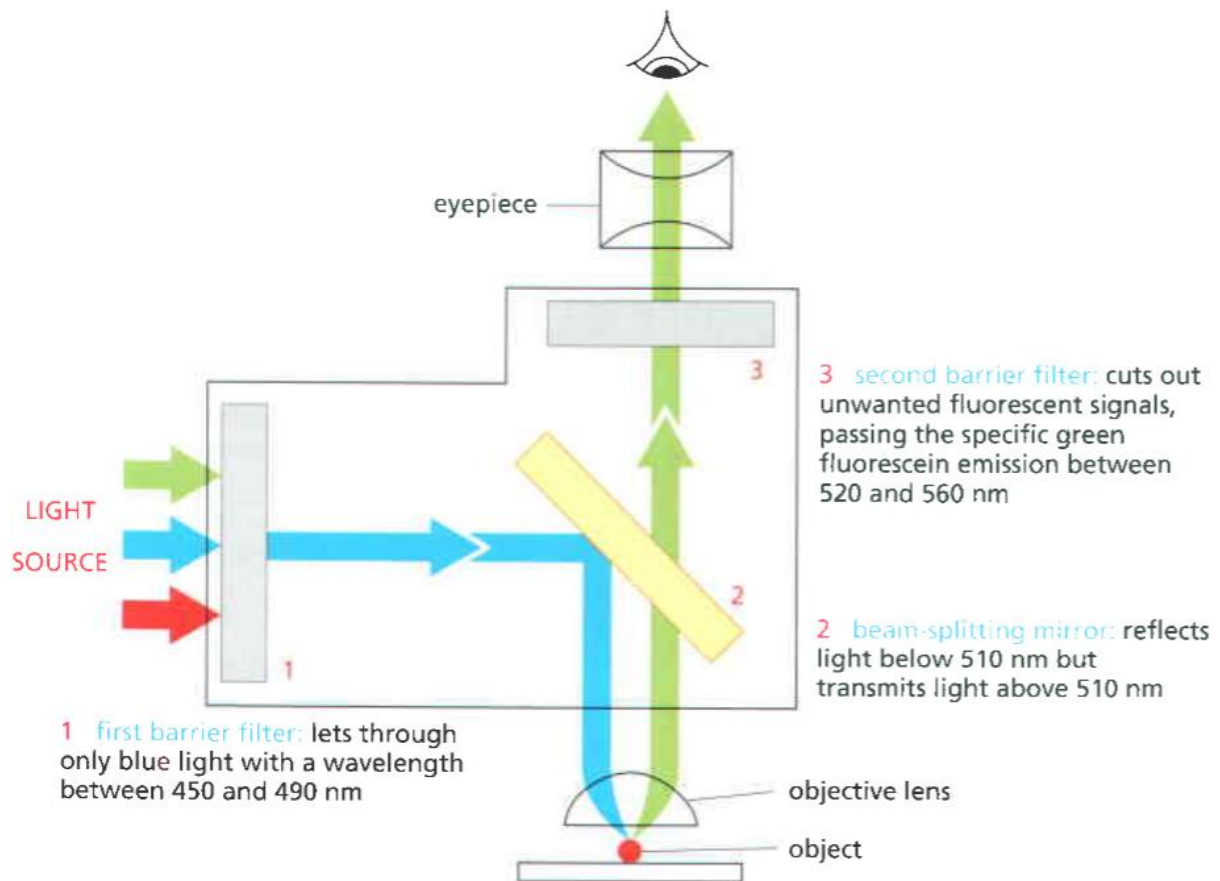
Fosforesenssiksi kutsutaan molekyylin emissiota, joka syntyy, kun viritys purkautuu niin sanotulta triplettitilalta perustilalle. Fluoresenssin tapauksessa viritystilan parittomien elektronien spinit ovat vastakkaissuuntaiset, jolloin tilaa kutsutaan singlettitilaksi. Jos virittyneen elektronin spin kääntyy, ovat viritystilan parittomien elektronien spinit samansuuntaiset, ja tilaa kutsutaan triplettitilaksi. Koska virityksen purkautuminen triplettitilalta perustilalle vaatisi perustilalle palaavan elektronin spinin kääntymisen, on fosforesenssi käytännössä epätodennäköisempi ja pitkäikäisempi prosessi kuin fluoresenssi. Fluoresenssin elinikä vaihtelee pikosekunneista 10^{-12} s nanosekunteihin 10^{-9} s kun taas fosforesenssin elinikä voi olla kestoaltaan millisekunneista jopa tunteihin.⁹ Fosforesenssia sovelletaankin tavallisesti pidempään kestävänsä säteilynsä vuoksi esimerkiksi hohtavissa leluissa, kellon viisareissa tai maaleissa.^{2,5} Kuvassa 2 havainnollistetaan molekyylin virittymistä ja mahdollisia viritystiloja sekä tapoja, joilla molekyylin viritystila voi purkautua.



Kuva 2. Kohdassa i molekyyli absorboi valoa ja virittyy tilalle S_1 tai S_2 . Kohta ii kuvastaa molekyylin sisäistä viritystilaa siirtymää alemmalle tilalle S_1 . Viritys voi purkautua tilalta S_1 emittoimalla valoa eli fluoresoimalla kohdan iii osoittamalla tavalla. Molekyylin viritys voi purkautua tilalta S_1 myös ilman fluoresenssia katkoviivojen osoittamalla tavalla, missä iv:llä kuvataan säteilemätöntä siirtymää viritystilalta perustilalle ja v:llä FRET siirtymää (Förster resonance energy transfer). Jos molekyyli siirtyy (vi) triplettitilalle T_1 ja viritys purkautuu kohdan vii mukaisesti emittoimalla valoa, kutsutaan ilmiötä fosforesenssiksi. Kohta viii kuvaa säteilemätöntä siirtymää triplettitilalta perustilalle.¹⁰

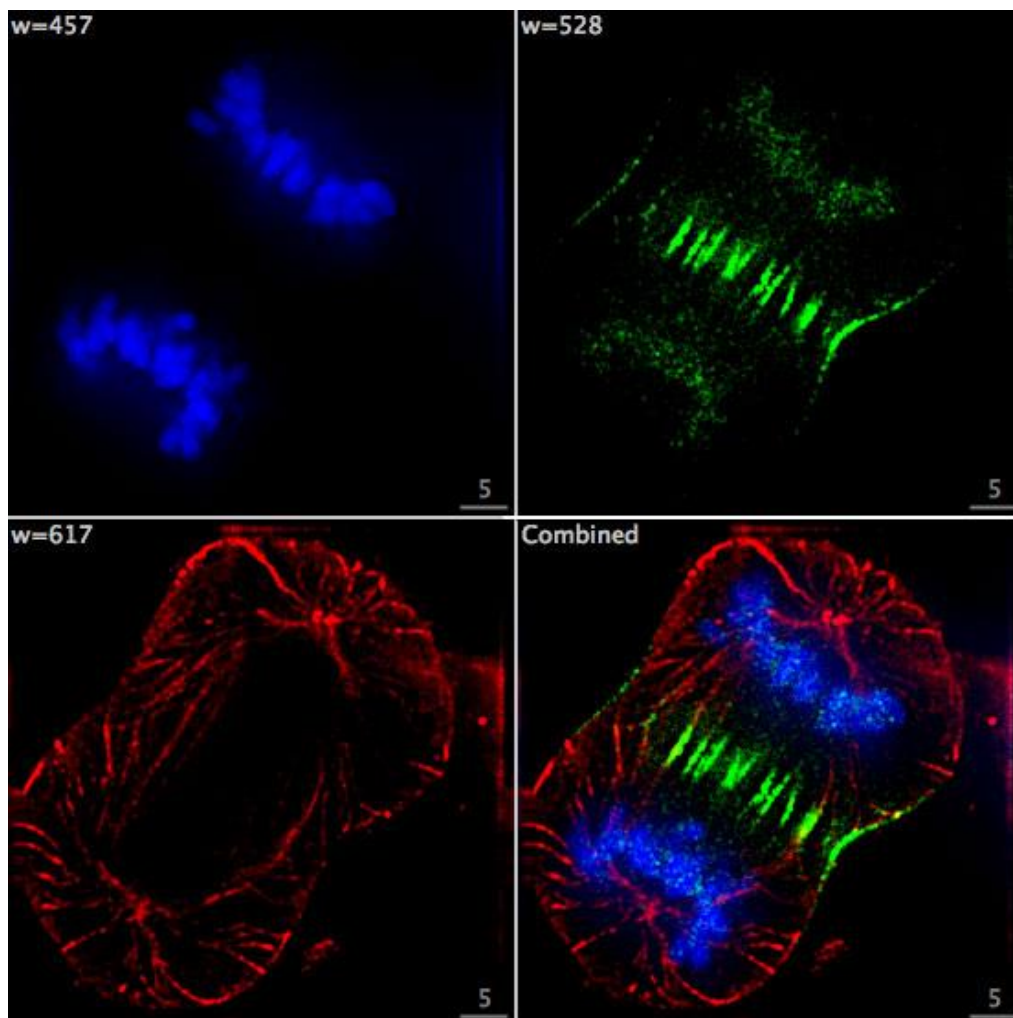
2.1 Fluoresenssimikroskooppi

Koska fluoresoiva molekyyli absorboi ensin valoa tietyllä aallonpituudella ja sitten emittoi valoa tietyllä hieman pidemmällä aallonpituudella, on mikroskoopissa oltava kaksi suodatinta. Ensimmäinen suodatin suodattaa näytteeseen menevän valon siten, että vain molekyylin absorboimat aallonpituudet pääsevät siitä läpi. Puoliläpäisevä peili (beam split mirror) heijastaa valon kohti näytettä, mutta päästää näytteestä tulevan valon lävitseen toiselle suodattimelle. Linssi taittaa ja kohdistaa näytteeseen menevän ja siitä palaavan valon. Toinen suodatin suodattaa näytteestä tulevan valon siten, että mikroskoopin avulla nähdään vain molekyylin emittoima fluoresoiva valo. Näin piirtyy kuva ”hohtavasta” molekyylistä pimeää taustaa vasten. Fluoresenssimikroskoopin rakennetta ja toimintatapaa havainnollistetaan kuvassa 3.¹¹



Kuva 3. Fluoresenssimikroskoopin perustoimintaperiaate.¹¹

Nykyiset fluoresenssimikroskoopit on kohdennetusti kehitetty vastaamaan lukuisia eri tarpeita ja kuvantamismenetelmiä. Valoa voidaan esimerkiksi kohdistaa pienelle alueelle ja sitten liikuttaa näytettä sivuttais- ja syvyysuunnassa. Näin saatu kuvamateriaali voidaan käsitellä ohjelmilla ja koostaa kolmiulotteiseksi kokonaiskuvaksi tutkittavasta molekyylistä. Näytteessä voi olla myös useita eri väriaineita eri kohdissa tutkittavaa näytettä. Näin voidaan esimerkiksi kuvantaa värikäs kokonaiskuva useammasta tekijästä koostuvasta tapahtumasta solussa.¹¹ Kuvassa 4 nähdään esimerkki siitä, kuinka erilaisilla fluoresoivilla väriaineilla on värjätty solun eri toiminnallisia osia, ja kuinka kuvat voidaan koostaa yhteen.



Kuva 4. Syöpäsolun jakaantuminen fluoresenssin avulla kuvattuna. DNA (sininen), mikrotubulus (punainen) ja INCENP-proteiini (vihreä).¹²

3 Fluoresenssimikroskopian hyödyntäminen solubiologiassa

Fluoresenssimikroskopia on tehokas ja laajasti käytetty menetelmä, jota voidaan käyttää muun muassa proteiinien ja muiden molekyylien visualisoimiseen soluissa ja kudoksissa. Fluoresenssimikroskopiolla voidaan tehdä molekyylien rakenteen, sijainnin ja vuorovaikutuksien lisäksi havaintoja myös muutoksista pH:ssa ja suolojen määrässä.^{10,13} Fluoresenssimikroskopia on lisäksi ainut menetelmä, jolla voidaan tarkastella ja kuvantaa elävissä soluissa tapahtuvia muutoksia ja vuorovaikutuksia. Niinpä fluoresenssimikroskopiasta onkin tullut yhä tärkeämpi tutkimusmenetelmä solubiologiassa, minkä vuoksi sekä mikroskopiategniikoita että väriaineita on viime vuosina kehitetty kiihtyvään tahtiin kysynnän kasvaessa.

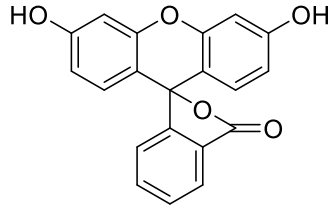
3.1 Fluoresoivat väriaineet

Fluoresoivia väriaineita on löydetty jo kauan ennen kuin niitä osattiin hyödyntää ja soveltaa yhtä laajasti kuin tänä päivänä. Monia uusia väriaineita on kehitetty sen jälkeen ja niitä pyritään löytämään yhä edelleen lisää. Nykyään uusien fluoresoivien väriaineiden kehittämisen lisäksi jo tunnettuja väriaineita tutkitaan paljon. Muun muassa niiden soveltuvuutta ja käyttömahdollisuuksia eri ympäristöissä ja käyttötarkoituksissa halutaan kartoittaa. Jos väriaine ei syystä tai toisesta sovellu tiettyyn ympäristöön tai käyttötarkoitukseen, tutkitaan, voidaanko väriaineen rakennetta muuttaa siten, että se toimisi halutulla tavalla tai paremmin kuin ennen. Seuraavassa kappaleessa keskitytään tarkemmin yhteen yleisimmin käytetyistä fluoresoivista väriaineista, fluoreseiiniin, sekä sen johdannaisiin ja näiden ominaisuuksiin.

Fluoreseiini

Fluoreseiini on yksi tunnetuimmista ja laajimmin käytössä olevista väriaineista, jonka tunnettu saksalainen kemisti Adolf von Baeyer syntetisoi ensi kerran vuonna 1871. Fluoreseiinista on valmistettu kymmenittäin eri johdannaisia, joissa fluoreseiinin ominaisuudet on räätälöity soveltumaan paremmin muun muassa lääketieteen ja solubiologian tarpeisiin. Fluoreseiinin rakennetta muokkaamalla fluoreseiinijohdannaisille voidaan valita esimerkiksi eri absorptio- ja emissioaallonpituudet, eri pK_a -arvo, tai valjastaa johdannaisesta indikaattori biologisesti

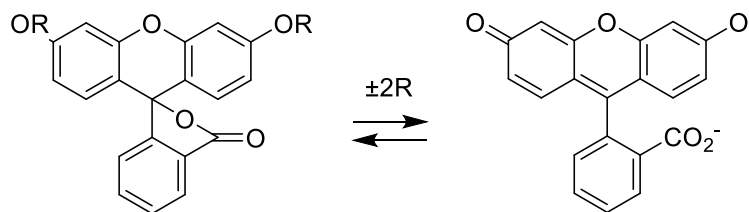
tärkeille ioneille kuten esimerkiksi natriumille, kalsiumille tai sinkille. Fluoreseiini absorboi sinistä valoa ja fluoresoi vihreää valoa.^{10,13} Fluoreseiinin rakenne on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Fluoreseiinin rakenne.

Fluori- ja kromisubstituutioilla voidaan esimerkiksi laskea fluoreseiinin pK_a -arvoa ja tuottaa johdannaisia, joiden pH-herkkyys on pienempi ja fotostabiilisuus suurempi. Esimerkiksi 2,7-difluorifluoreseiini, Oregon Green, on happamampi ja fotostabiilimpi kuin fluoreseiini. Kloorin tapaisten substituenttien lisääminen madaltaa pH-herkkyuden lisäksi myös viritysaallonpituutta. Näistä johdannaisista esimerkiksi 2,4,7,7-tetrakloorifluoreseiinia (TET) voidaan käyttää väriaineena DNA:n sekvensoinnissa.¹³

Yksi fluoreseiinin oleellisista piirteistä on se että, molekyyli on tasapainossa fluoresoimattoman suljetun laktonimuodon ja fluoresoivan avoimen kinonimuodon välillä. Fenolisten ryhmien asyloinnilla tai alkyloinnilla voidaan lukita molekyyli fluoresoimattomaan laktonimuotoon (kuva 6). Tämä ominaisuus toimii perustana monien entsyymien kuten esimerkiksi esteraasien, fosfataasien ja glykosylaasien fluoresoiville substraateille.^{10,13}

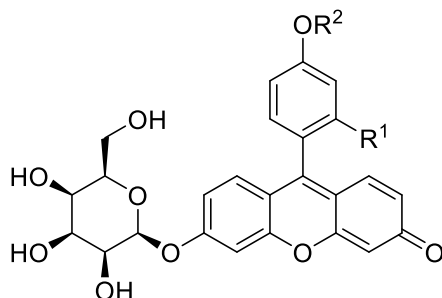


Kuva 6. Fluoreseiinin laktoni- ja kinonimuoto.

Vuonna 2005 Urano *et al.*¹⁴ havaitsivat, että fluoresenssin osalta oletetusti välttämätön karboksyyli-ryhmä voidaan korvata muilla substituenteilla säilyttäen silti molekyylin fluoresoivat ominaisuudet. Tämä johti uusien fluoresoivien johdannaisten ja merkkiaineiden

löytämiseen ja kehittämiseen. Havainnon seurauksena kehitettiin uusia β -galaktosidaasimerkkiaineita galaktosidaasientsyymien paikantamiseksi.¹⁴ Galaktosidaasientsyymien aktiivisuuden tiedetään olevan tavallista korkeampi tietyissä syöpäsoluissa, sillä jo vuonna 1979 raportoitiin munasarjasyövän kasvainsoluissa olevan terveisiin soluihin verrattuna suurempi galaktosidaasiaktiivisuus.¹⁵ β -galaktosidaasimerkkiaineilla voidaan seurata solun galaktosidaasiaktiivisuutta, koska merkkiaine muuttuu fluoresoivaksi vasta, kun galaktosidaasientsyymi irrottaa galaktoosin merkkiainemolekyylistä.^{14,16}

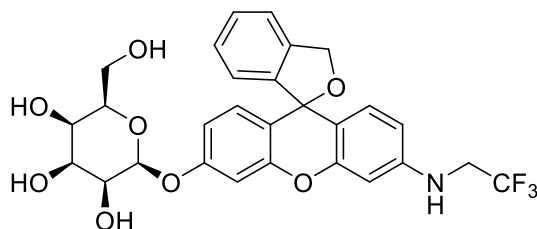
Vuonna 2007 Kamiya *et al.*¹⁶ kehittivät β -galaktosidaasimerkkiainetta TG- β Gal edelleen, ja valmistivat uuden β -galaktosidaasimerkkiaineen (AM-TG- β Gal), joka reagoituaan galaktosidaasin kanssa tuotti hyvin fluoresenssinsa säilyttävän hydrofiilisen lopputuotteen. Merkkiainetta kokeiltiin hiirien vatsakalvon sisäisten kasvaimien visualisointiin ja sillä kyettiin havaitsemaan halkaisijaltaan vain 200 μ m kokoisia kasvaimia. Kuvassa 7 on esitetty β -galaktosidaasimerkkiaineen perusrakenne.^{14,16}



Kuva 7. β -galaktosidaasimerkkiaineen perusrakenne, missä R^1 on joko OMe tai Me ja R^2 on joko CH_2COOMe tai $(\text{CH}_2)_4\text{COOMe}$.¹⁶

Vuonna 2014 Asanuma *et al.*¹⁷ osoittivat ensin galaktosidaasiaktiivisuuden olevan korkea useissa eri munasarjasyöpätyypeissä ja kehittivät sitten uuden β -galaktosidaasimerkkiaineen (HMRef- β Gal, kuva 8), joka visualisoi kaikki tutkimuksessa käytetyt syöpäsolutyypit jo viisi minuuttia merkkiaineen lisäyksen jälkeen. Tunnin kuluttua merkkiaineen lisäämisestä jopa 1 mm kokoiset etäpesäkkeet olivat voimakkaan fluoresenssin johdosta havaittavissa paljaalla silmällä. Etäpesäkkeiden löytäminen on tärkeää sillä 60-75%:lla munasarjasyöpäpotilaista on todettu olevan etäpesäkkeitä vatsakalvolla, ja etäpesäkkeiden poistamisen on osoitettu

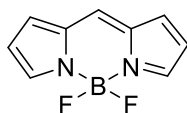
parantavan potilaan ennustetta. Etäpesäkkeiden poistaminen ilman merkkiainetta on vaikeaa, sillä ne ovat pieniä ja vaikeasti erotettavissa terveistä soluista.¹⁷



Kuva 8. HMRef-βGal-merkkiaineen rakenne.

BODIPY

BODIPY (dipyrrometeenibooridifluoridi) on melko uusi fluorofori, joka on rakenteeltaan pieni ja yksinkertainen sekä ominaisuuksiltaan monia väriaineita parempi. Molekyylillä on suhteellisen pooliton eikä sillä ole varausta, mikä tekee siitä epäherkän liuottimen poolisuudelle ja pH:lle. Pienen kokonsa ja painonsa vuoksi se voidaan liittää osaksi pienempiäkin molekyyliä kuten esimerkiksi nukleotideja ja aminohappoja. BODIPY-molekyylillä voidaan myös liittää muun muassa proteiineihin, rasvahappoihin, fosfolipideihin, lipopolysakkarideihin sekä entsyymien substraatteihin. Molekyylin emissiovyö on kapea, minkä vuoksi sen intensiteetti on voimakkaampi kuin esimerkiksi fluoreseiinillä. Lisäksi BODIPY:n erilaiset johdannaiset voivat olla eri värisiä, kun taas monien muiden väriaineiden ja niiden johdannaisten värialue on kapea. BODIPY-molekyylin rakenne on esitetty kuvassa 9.¹⁸



Kuva 9. Dipyrrometeenibooridifluoridin (BODIPY) rakenne.

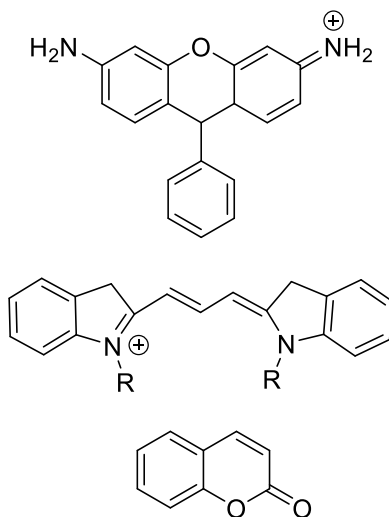
Vuonna 2008 Hölttä-Vuori *et al.*¹⁹ valmistivat niin kutsun BODIPY-kolesteroli johdannaisen kuvantaakseen kolesterolin solunsisäistä aineenvaihduntaa. Tutkimusryhmän valmistama BODIPY-kolesteroli tunkeutui nopeasti soluihin ja sen osoitettiin vastaavan ominaisuuksiltaan

ja toiminnaltaan kolesterolia. Kun BODIPY-kolesterolia lisättiin seeprakalan (*danio rerio*) hedelmöittyneen munan ruskuaispussiin ja odotettiin toukkavaiheeseen saakka, voitiin havaita, että kolesteroli ei ollut jakaantunut aivoissa tasaisesti. Näin BODIPY-kolesterolin avulla saatiin uutta kuvamateriaalia ja tietoa kolesterolin aineenvaihdunnasta keskushermostossa.¹⁹

Esimerkkejä muista väriaineista

Fluoresenssimikroskopiassa käytettäviä muita väriaineita ovat esimerkiksi rodamiini, syaniini ja kumariini (kuva 10) sekä niiden johdannaiset. Monille fluoresoivien väriaineiden johdannaisille on löydetty käyttöä myös lääketieteen saralla. Esimerkiksi Yaohui *et al.*²⁰ osoittivat, että Rh6G-rodamiinijohdannainen tunnistaa *E. coli* -bakteerin tutkittavasta näytteestä. Oikeissa olosuhteissa fluoresenssin intensiteetti on suoraan verrannollinen *E. coli* -bakteerien pitoisuuteen näytteessä.²⁰

Alexa-ryhmän väriaineista monet ovat tunnettujen väriaineiden, kuten esimerkiksi fluoreseiinin, rodamiinin, kumariinin ja syaniinien, johdannaisia. Nykyisin tuoteryhmä kuuluu Thermo Fischer Scientific -yhtiön valikoimiin.²¹



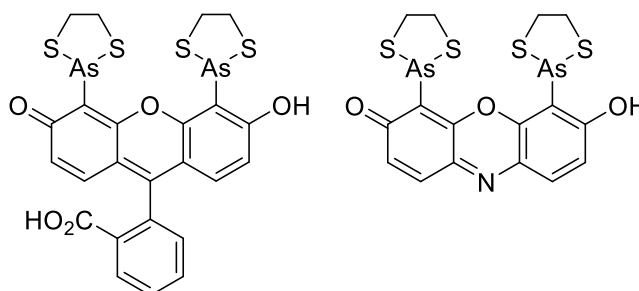
Kuva 10. Rodamiini (ylin), syaniini Cy3 ja kumariini (alin).

4 Proteiinien fluoresenssimikroskopiasta

Soluissa on hyvin laaja kirjo erilaisia yhdisteryhmiä, joilla on keskeinen merkitys solun rakenteen ja toiminnan kannalta. Näitä ovat mm. lipidit, steroidit ja nukleotidit. Proteiinit ovat yksi solun laajakirjoisemmista yhdisteryhmistä. Proteiinit voivat toimia mm. solun viestintäaineena tai rakennusosana. Yksi solun ja elämän toiminnan kannalta merkittävin proteiinien toiminnallinen ryhmä on entsyymit. Koska entsyymit osallistuvat lukuisiin solun reaktioihin, ovat ne pitkään olleet mielenkiinnon ja tutkimuksen keskiössä. Monia entsyymejä osataan myös hyödyntää useissa eri sovelluksissa kuten esimerkiksi DNA:n monistamisessa tai muokkaamisessa.²² Vaikka proteiineja voidaan kuvantaa esimerkiksi röntgenkristallogafian²² avulla, ovat fluoresenssimikroskopiset menetelmät ainoita, joilla voidaan tutkia eläviä soluja. Jokaisen proteiinin kuvantaminen vaatii aina tapauskohtaisen suunnitelman luomista ja tehokkaimman menetelmän kartoittamista. Vaikka proteiineista on jo paljon tutkittua tietoa, on niiden rakenteessa ja toiminnassa vielä runsaasti tutkittavaa. Seuraavaksi käydään läpi muutamia yleisimmistä proteiinien kuvantamiseen käytetyistä menetelmistä.

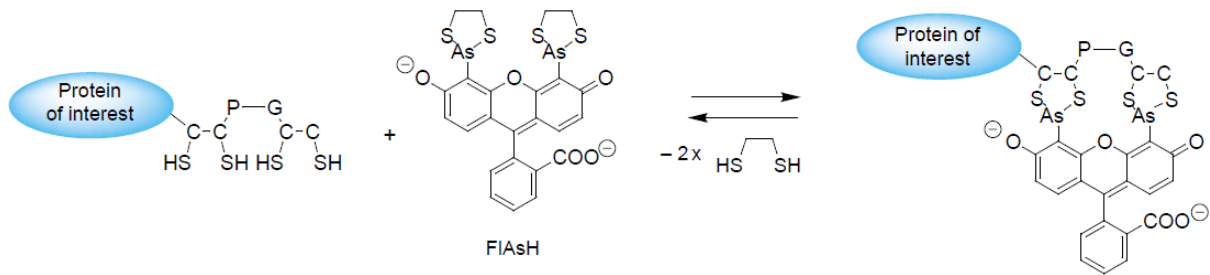
4.1 Väriaineen liittäminen suoraan tutkittavaan proteiiniin

Fluoresoiva väriaine voidaan liittää suoraan tarkastelun kohteena olevaan proteiiniin, edellyttäen että valmistettu proteiini-väriaine-johdannainen säilyttää proteiinille luontaiset ominaisuudet ja toimintatavat. Väriaine voidaan esimerkiksi liittää proteiinin tiettyihin aminohappoihin. Useita väriainemolekyylejä, kuten esimerkiksi biarseeniset fluoreseinin ja kumariinin johdannaiset FAsH- ja ReAsH-väriaineet (kuva 11), on valmistettu juuri tähän tarkoitukseen.²³



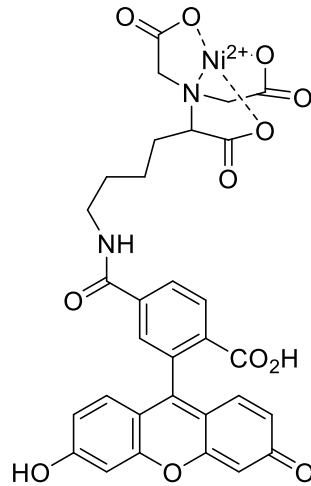
Kuva 11. FAsH-(vasemmalla) ja ReAsH-(oikealla)väriaineet.

Väriaine tarttuu proteiinissa neljän kysteiniiniaminohapon jaksoon, jotka ovat järjestyksessä Cys-Cys-X-X-Cys-Cys, jossa X on jokin muu aminohappo kuin kysteini. FIAsh-väriaineen kiinnittymistä tutkittavaan proteiiniin havainnollistetaan kuvassa 12.



Kuva 12. FIAsh-väriaineen kiinnittymistapa neljän kysteiniiniaminohapon jaksoon.²⁴

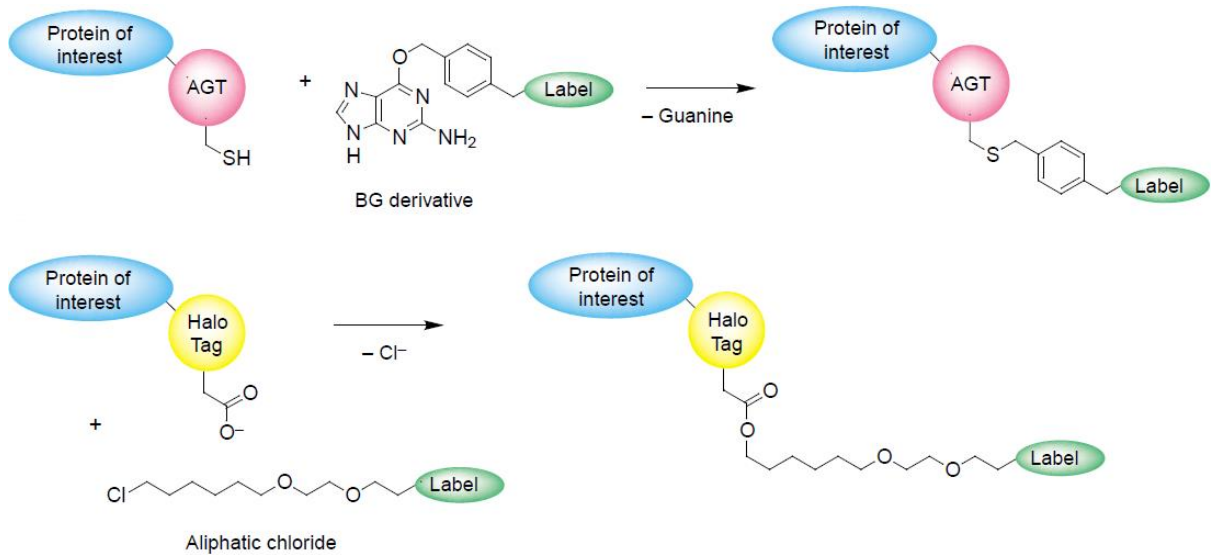
Osa väriaineista sitoutuu kovalenttisten sidosten sijaan merkkiaineessa olevan metallikeskusatomien avulla muodostaen kompleksin, kuten esimerkiksi histidine-tag- (kuva 13) ja flag-tag-merkkiaineet. Flag-tag-merkkiaine sitoutuu asparagiinihappoaminoacidoihin (Asp) ja histidine-tag-merkkiaine histidiiniaminoacidoihin (His).²³ Histidine-tag-merkkiainetta on käytetty esimerkiksi tutkittaessa solukalvon 5HT₃-serotoniini-reseptoreja. Histidine-tag-merkkiaineiden osoitettiin aluksi kiinnittyvän vihreään fluoresoivaan proteiiniin, jossa on kuuden histidiiniaminohapon jakso (GFP-His₆). Seuraavaksi 5HT₃-serotoniinireseptoreihin liitettiin geneettisesti useisiin kohtiin kuuden histidiiniaminohapon jaksoja. Tämän jälkeen reseptorin eri kohtiin tarttuneiden histidine-tag-merkkiaineiden sijaintien perusteella pystyttiin tekemään laskelmia ja päätelmiä, jotka toivat tietoa reseptorin muodosta ja rakenteesta.²⁵



Kuva 13. Histidine-tag-merkkiaineen perusrakenne.

SNAP-, CLIP- ja Halo-tag-menetelmät

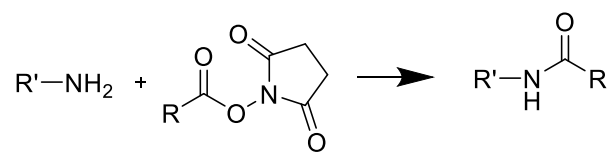
Myös SNAP-, CLIP- ja Halo-tag-menetelmiä käytetään yleisesti. Menetelmissä tutkittavaan proteiiniin liitetään geneettisesti SNAP-, CLIP- tai Halo-tag-ryhmä. Näissä proteiineihin kiinnitetyissä ryhmissä on funktionaalinen ryhmä, jonka avulla merkkiaineeseen voidaan helposti liittää muita molekyyliä. Esimerkiksi SNAP-tagiin voidaan liittää väriaine O⁶-bentsyyliguaniinikantajan avulla. O⁶-Bentsyyliguaniiniin voidaan liittää erilaisia väriaineita, jotka jäävät kiinni proteiiniin guaniinin lohjetessa pois liitosreaktiossa. CLIP- ja Halo-tag-merkkiaineet toimivat vastaavalla tavalla siten, että CLIP-tag reagoi O⁶-bentsyyliisytosiini- ja Halo-tag kloorialkaanijohdannaisen kanssa. Väriaineen liittäminen proteiiniin SNAP- ja Halo-tag-menetelmän avulla on esitetty kuvassa 14.^{23,24}



Kuva 14. SNAP- ja Halo-tag-ryhmien käyttö väriaineen liittämiseksi proteiineihin. AGT, O⁶-alkyyliiguaaniinitransferaasi, on SNAP-tagissä käytettävä proteiini.²⁴

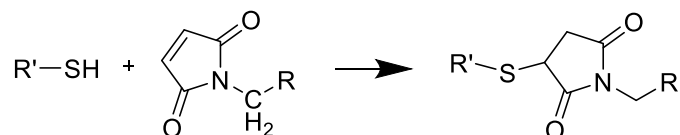
Väriaineen liittäminen amino- tai tioliryhmään

NHS-esteri (*N*-hydroksibutaani-imidi) on yksi tavallisimmin käytetyistä aktiivisista karboksyylihappojohdannaisista valmistettaessa amideja. Karboksyylihapporyhmän sisältäviä fluoroforeja voidaan liittää NHS-menetelmän avulla kohdeproteiinin aminoryhmään (kuva 15).



Kuva 15. Fluoroforin (R) liittäminen kohdeproteiiniin (R') NHS-esterin avulla.

Toiseksi yleisin aminohappojen funktionaalinen ryhmä, johon fluoresoiva merkkiaine liitetään, on tioli (-SH). Tiolit reagoivat helposti tuotteen tioetteri- tai disulfididokseen. Haluttu fluorofori on usein liitetty reagoivana yksikkönä toimivaan malemidiin, joka liittyy kaksoissidoksensa avulla tioliryhmään (kuva 16).²³



Kuva 16. Fluoroforin (R) liittäminen kohdeproteiinin (R') tioliryhmään malemidin avulla.

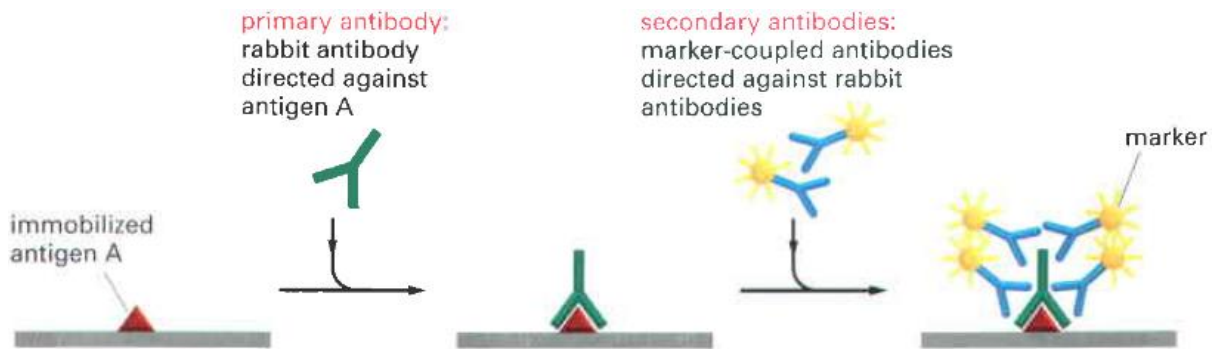
Muita menetelmiä fluoroforin liittämiseksi proteiiniin ovat muun muassa atsidi- ja tetratsiinileimaus.²³ Tetratsiinileimausta on käytetty muun muassa elävien rintasyöpäsolujen reseptoriproteiinien tutkimisessa.²⁶

Vaikka reaktiot ovat nopeita ja niiden saanto on usein hyvä, saattaa niiden huono selektiivisyys tai sopimattomuus *in vivo* olosuhteisiin toimia esteenä merkkiaineen käytölle elävien solujen tutkimukseen.²³

4.2 Väriaineen liittäminen proteiinin tunnistavaan molekyyliin

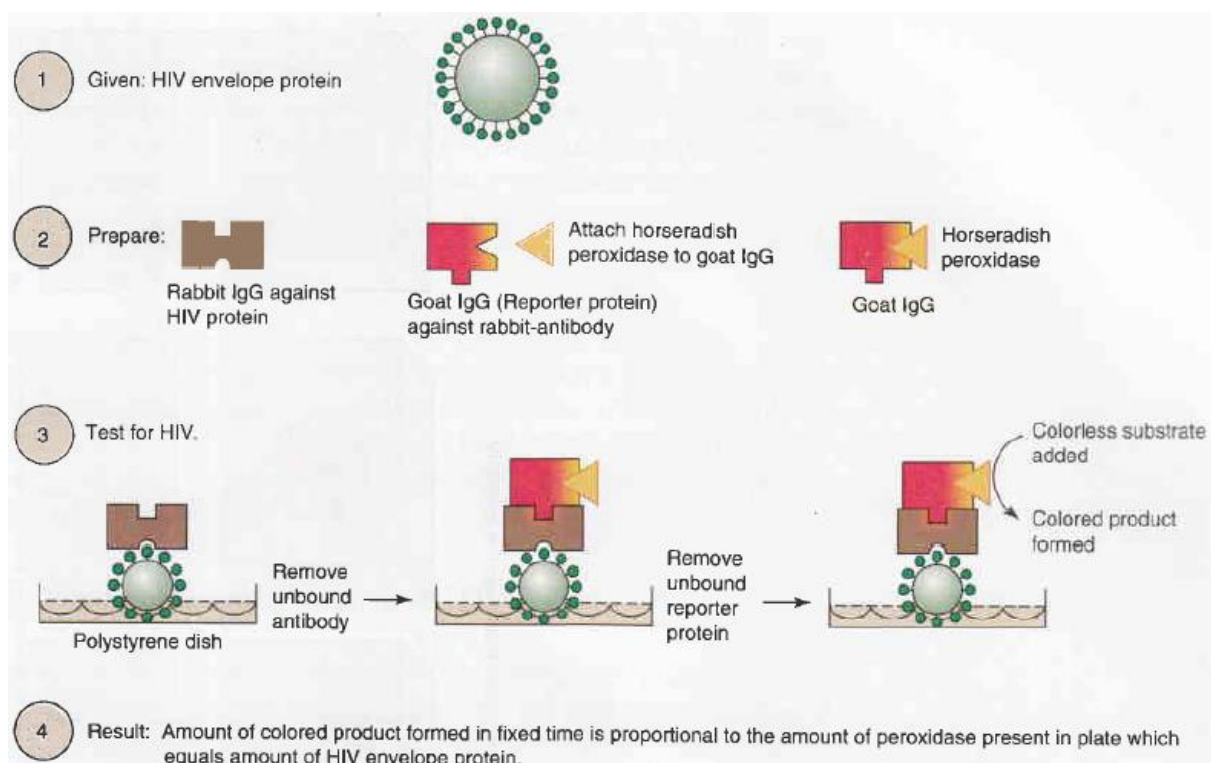
Fluoroforin liittäminen proteiinin tunnistavaan molekyyliin voi olla tehokkaampi tai jopa ainut menetelmä tiettyjä proteiineja tutkittaessa. Tällöin on löydettävä molekyyli, joka sitoutuu spesifisesti tutkittavaan proteiiniin, ja tutkittava miten ja millainen fluorofori tähän molekyyliin voidaan liittää.

Eräs tällainen proteiinin tunnistava yhdisteryhmä on vasta-aineet. Vasta-aine (antibody), on elimistön immuunijärjestelmän tuottama erityinen proteiini, jonka tehtävänä on tunnistaa ja tarttua tiettyyn elimistölle vieraaseen aineeseen, antigeeniin. Vasta-aineeseen voidaan liittää väriaine, jolloin se toimii merkkiaineena tietyille antigeenille. Menetelmää havainnollistetaan kuvassa 17, jossa antigeenin A tunnistavan vasta-aineen (primary antibody) sijaan, merkkiaine liitetään toiseen vasta-aineeseen (secondary antibody), joka kiinnittyy primääriseen vasta-aineeseen. Kiinnittämällä väriaine sekundääriseen vasta-aineeseen, voidaan välttää primäärisen vasta-aineen häiriintyminen kiinnitettävästä väriainemolekyylistä johtuen sekä saavuttaa voimakkaampi signaali, sillä primääriseen vasta-aineeseen voi tarttua useampi sekundäärinen vasta-aine. Tätä menetelmää kutsutaan epäsuoraksi immunosytokemiaksi (kuva 17).^{11,27}



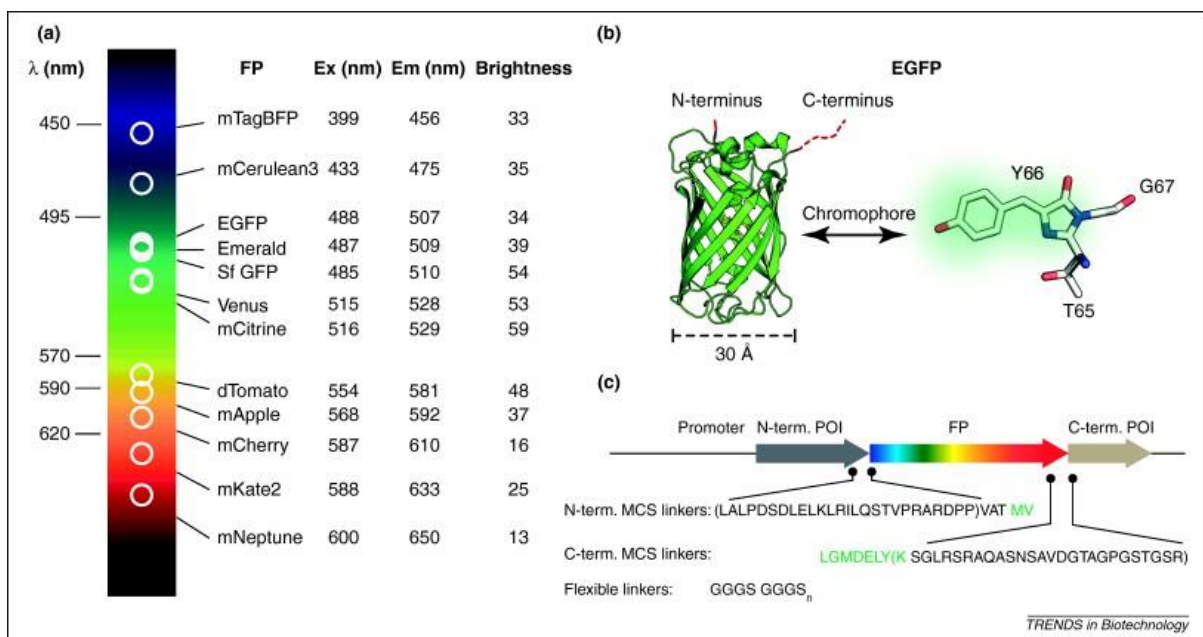
Kuva 17. Epäsuoran immunosytokemian toimintaperiaate.¹¹

Myös tunnettu ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) -tekniikka, jota hyödynnetään muun muassa HI-viruksen ja allergeenien tunnistamisessa, perustuu merkkiaineen liittämiseen vasta-aineisiin. Esimerkiksi HI-viruksen tunnistamisessa voidaan käyttää viruksen pintaproteiinin IgG vasta-ainetta ja sitä tunnistavaa sekundääristä vasta-ainetta, jossa on fluoresoiva leima. Fluoresenssi on verrannollinen viruksen pitoisuuteen ja sitä voidaan verrata standardikäyrään. Kuvassa 18 havainnollistetaan tämän HIV-testin toimintaperiaate vaiheittain.²⁸



Kuva 18. HIV-testin toimintaperiaate vaiheittain ELISA-menetelmällä.²⁸

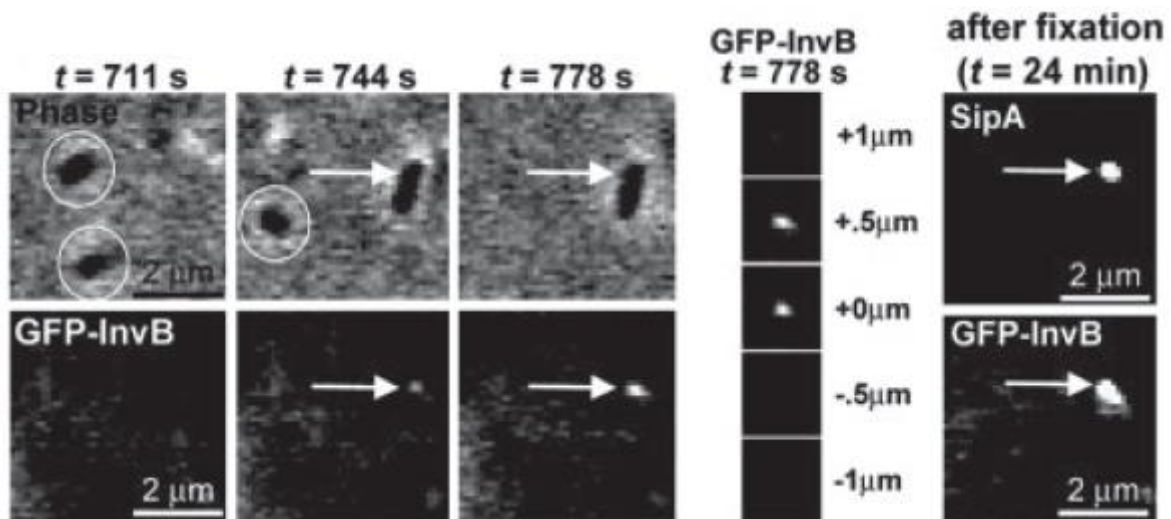
Tutkittavaan proteiiniin voidaan liittää myös fluoresoivia proteiineja (FP), kuten esimerkiksi vihreä fluoresoiva proteiini (green fluorescent protein, GFP), joka on alun perin eristetty bioluminoivasta meduusasta (*Aequorea victoria*). Fluoresoivista proteiineista osa on eristetty muista eliöistä ja osa on kehitetty ja valmistettu laboratoriossa.²⁹ Fluoresoivat proteiinit ovat perusrakenteeltaan sylinterimäisiä molekyyliä, joissa fluoresoiva osa on sylinterirakenteen sisällä (kuva 19). Vaikka fluoresoivat proteiinit sopivat hyvin *in vivo* -olosuhteisiin, ne saattavat vaikuttaa kohdeproteiinin konformaatioon tai toimintaan suuren kokonsa vuoksi.^{29,30}



Kuva 19. a) Erilaisten fluoresoivien proteiinien absorptio- ja emissioaallonpituudet, b) muokatus vihreän fluoresoivan proteiinin rakenne (EGFP, enhanced green fluorescent protein), c) GFP:n genettinen liittäminen tutkittavaan proteiiniin.³⁰

Fluoresoiva proteiini voidaan liittää tarkasteltavaan proteiiniin yhdistämällä GFP:a ja tutkittavaa proteiinia koodaavat DNA-jaksot. Tämä rekombinantti-DNA voidaan sitten injektoida soluun ja saada näin solu tuottamaan tutkittavaa proteiinia, johon GFP on kiinnittynyt.³¹ Rekombinantti-DNA:ta hyödyntävää menetelmää on käytetty muun muassa tutkittaessa tautia aiheuttavien bakteerien toimintaa. Esimerkiksi vuonna 2005 Schluberger *et al.*³² tutkivat miten salmonellabakteeri (*Salmonella enterica serovar. typhimurium*) tarttuu isäntäsoluun ja injektioi useita erilaisia tulehduttaavia proteiineja sen sisään. Näiden proteiinien tarkoituksena on muun muassa lamata solun puolustus. Yksi salmonellabakteerin injektioimista

proteiineista on nimeltään SipA. Bakteerin solulimassa puolestaan on InvB-proteiini, joka tarttuu SipA-proteiiniin mutta ei itse erity isäntäsoluun. Schlubger tutkimusryhmineen valmisti tästä InvB-proteiinista InvB-GFP-merkkiaineen, joka saatiin ilmentymään isäntäsolussa geenimuuntelun avulla. SipA-proteiinin tunnistavan InvB-GFP-merkkiaineen avulla tutkimusryhmä onnistui saamaan reaaliaikaista videokuvaa siitä, miten salmonellabakteeri erittää SipA-proteiinia isäntäsoluun telakoitumisensa jälkeen. Tutkimuksessa salmonellabakteeri pystyi nopeimmillaan toimittamaan jopa kymmenessä sekunnissa telakoitumisesta ensimmäiset tulehduttavat proteiinit isäntäsolun sisälle.³² Vastaavanlaiset tutkimukset tuovat tärkeää tietoa siitä, miten taudinaiheuttajat toimivat. Kuvassa 20 on esitetty kuvasarja tutkimusryhmän reaaliaikaisesta kuvamateriaalista, jossa salmonellabakteeri injektoi SipA-proteiinia InvB-GFP-merkkiainetta ilmentävään isäntäsoluun.



Kuva 20. Vasemmalla kuvasarja (t=aika) SipA-proteiinien injektoinnista InvB-GFP-merkkiainetta ilmentävään isäntäsoluun. Kuvasarjan ympyröidyt salmonellabakteerit eivät ole telakoituneet isäntäsoluun. 24 minuutin jälkeen (kuva oikealla) InvB-GFP-merkkiaineen ja SipA-proteiinin konjugaatti.

5 Yhteenveto

Fluoresenssi ja fosforesenssi ovat osa luminesenssi-ilmiötä, jota sovelletaan monipuolisesti niin viihteen ja teollisuuden kuin myös monien eri tieteenalojen menetelmissä ja tutkimuksissa. Luminoidessaan aine säteilee eli emittoi valoa tietynlaisen elektronisen viritystilan purkautuessa, mikä voidaan tuottaa esimerkiksi kemiallisen reaktion, sähköön tai sähkömagneettisen säteilyn avulla. Fluoresenssimikroskopiassa fluoresoivaan molekyyliin kohdistetaan sähkömagneettista säteilyä sillä taajuudella, jolla se virittyy. Virityksen purkautuessa emittoituvaa säteilyä voidaan käyttää molekyylin visualisointiin. Koska fluoresenssimikroskopia on tapa, jolla voidaan tarkastella ja kuvantaa elävissä soluissa tapahtuvia muutoksia ja vuorovaikutuksia, on fluoresenssimikroskooppien lisäksi myös fluoresoivia väriaineita ja niiden käyttöä tutkittu ja kehitetty kiihtyvään tahtiin. Fluoreseiniä, BODIPY:ä ja monia muita fluoresoivia väriaineita on tutkittu tarkoituksena kehittää niistä johdannaisia, joiden ominaisuudet on räätälöity eri käyttötarkoituksiin ja olosuhteisiin paremmin soveltuviksi. Jokainen tutkimus vaatii yleensä fluoresoivan väriaineen valinnan arviointia ja sen käytön tapauskohtaista suunnittelua.

Proteiinit ovat eräitä solun tärkeimmistä ja monipuolisimmista toiminnallisista molekyyleistä, joihin voidaan liittää fluoresoivia väriaineita monin eri tavoin. Proteiineja koodaaviin geeneihin voidaan esimerkiksi liittää tietty jakso siten, että solu liittää proteiinin rakenteeseen sen valmistuessa fluoresoivan proteiinin tai hyvän liitoskohdan halutulle väriaineelle. Tätä hyödynnetään esimerkiksi SNAP- CLIP- ja Halo-tag-menetelmissä. Proteiineissa on myös useita funktionaalisia ryhmiä, kuten amino- ja tioliryhmiä, joihin voidaan liittää väriaine esimerkiksi NHS-esterin tai malemidin avulla. Jotkut väriaineet, kuten esimerkiksi FIAsh-EDT₂- ja ReAsH-EDT₂-väriaineet, on puolestaan suunniteltu tarttumaan spesifisesti proteiinien tiettyjen aminohappojen jaksoihin. Tutkittavaa molekyyliä voidaan kuvantaa myös liittämällä väriaine tutkittavan molekyylin tunnistavaan molekyyliin, kuten esimerkiksi immuunijärjestelmän vasta-aineita soveltavassa ELISA-menetelmässä. Fluoresenssimikroskooppiset menetelmät tuovat tärkeää tietoa solujen toiminnasta ja esimerkiksi eri sairauksien ja taudinaiheuttajien toimintatavoista, minkä vuoksi ne ovat korvaamattoman tärkeitä solubiologian ja lääketieteen monissa tutkimuksissa.

Kokeellinen osa

Pyreenijohdannaisten liittäminen koolihappoon

6 Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli liittää koolihappoon amidi- tai esterisidoksen avulla fluoresoiva pyreenijohdos, jolloin syntyvien konjugaattien käyttömahdollisuuksia kolesterolin merkkiaineena voitaisiin tarkastella mahdollisesti myöhemmissä tutkimuksissa. Koolihappo kuuluu sappihappoihin, joilla on tärkeä rooli muun muassa rasvojen ruoansulatuksessa. Koolihapon amfiifiilisessa rakenteessa on hydrofiilinen ja hydrofobinen puoli, jonka ansiosta se pystyy emulgoimaan rasvoja pienempiin osiin ja kuljettamaan niitä. Sappihapot toimivat myös muun muassa osana kolesterolin aineenvaihduntaa.³³ Koolihapon pyreenijohdannaisten odotetaan vuorovaikuttavan steroidirungon hydrofobisen β -puolen van der Waals-vuorovaikutusten avulla kolesterolin kanssa. Muodostuvien sidosten lisäksi koolihapon yhtäläinen samasta sterolirungosta johtuva muoto ja koko auttavat koolihapon kiinnittymisessä kolesteroliin.

7 Menetelmät, laitteet ja käytetyt reagenssit

Synteesituotteiden puhdistuksessa käytettiin ohutlevy- ja pylväskromatografiaa. Ohutlevykromatografiassa käytettiin Merckin TLC Silica gel 60 F₂₅₄-ohutlevyjä. Pylväskromatografiassa kiinteänä faasina käytettiin Merckin Silica gel 60 (0,04-0,063 mm) silikageeliä ja liikkuvana faasina dikloorimetaanista ja metanolista valmistettuja eluenteja suhteissa 90:10 ja 91:9. ¹H ja ¹³C NMR-mittaukset suoritettiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksen Bruker Avance III 300 MHz spektrometreillä. NMR-näytteiden liuottimina käytettiin deuteroitua metanolia ja kloroformia. ¹H-mittauksissa käytettiin referenssinä jäännösprotonisignaaleja $\delta(\text{CHCl}_3 = 7,26 \text{ ppm})$ ja $\delta(\text{CD}_3\text{OH} = 4,87 \text{ ppm})$. ¹³C-mittauksissa referenssinä käytetyt hiilisignaalit olivat $(\text{CDCl}_3 = 77,0 \text{ ppm})$ ja $\delta(\text{CD}_3\text{OD} = 49,17 \text{ ppm})$. Molekyylien kuvat ja reaktiokaaviot on piirretty käyttäen ChemDraw Professional 15.0-ohjelmaa. Massaspektrit mitattiin Micromass LCT ESI-TOF massaspektrometrillä ja analysoitiin Mass Lynx-ohjelmalla. Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin absorptiospektri mitattiin Varian Cary 100 Conc UV-Vis-spektrofotometrillä ja emissiospektri Varian Cary Eclipse-fluoresenssispektrofotometrillä. Taulukossa 1 on esitetty käytettyjen liuottimien puhtaus ja valmistaja.

Taulukko 1. Käytetyt liuottimet

| Liutin | Puhtaus | Valmistaja |
|--------------------|----------------|-------------------|
| Asetoni | 99,8 % | VWR |
| Asetonitrili | 99,99 % | Fisher chemical |
| Dikloorimetaani | 100 % | VWR |
| Dimetyyliformamidi | 99,9 % | VWR |
| Kloroformi | 99,98 % | Fisher chemical |
| Metanoli | 99,99 % | Fisher chemical |
| Tolueeni | 100 % | VWR |

Taulukossa 2 on esitetty käytettyjen reagenssien puhtaus ja valmistaja.

Taulukko 2. Käytetyt reagenssit

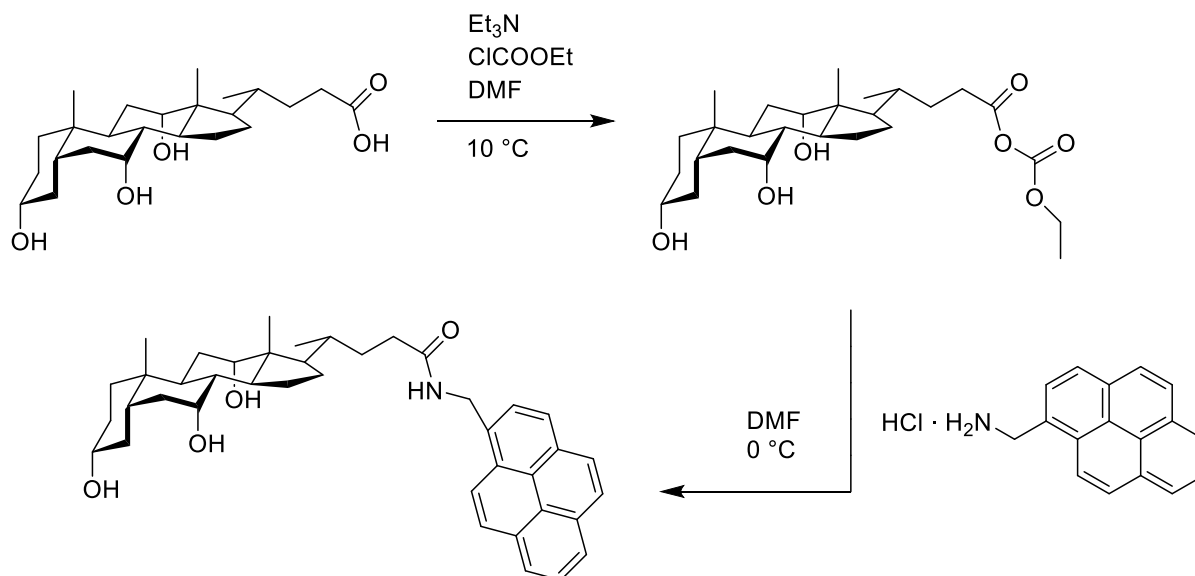
| Reagenssi | Puhtaus | Valmistaja |
|---------------------------|----------------|-------------------|
| Aminometyylipyridiini-HCL | 95 % | Sigma-Aldrich |
| Etyyliklooriformiaatti | 97 % | MERCK-Schuchardt |
| Koolihappo | ≥ 98 % | Sigma-Aldrich |
| 1-Pyreenimetanoli | 98 % | Sigma-Aldrich |
| Trietyyliamiini | ≥ 99 % | Sigma-Aldrich |

8 Synteetit

Kappaleessa esitellään kokeellisen osan synteetit pääpiirteittäin. Tarkat synteetiohjeet esitetään kappaleessa 11.

8.1 Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin valmistaminen

Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin synteetireitti on esitetty kaaviossa 1.



Kaavio 1. Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin synteesireitti

Etyyliklooriformiaatti ja trietyyliamiini tislattiin ennen käyttöä, ja DMF kuivattiin käyttäen molekyyliseuloja. Koolihappo liuotettiin DMF:iin ja siirrettiin kolmikaulakolviin, joka kiinnitettiin pystyjäähdyttäjään. Pystyjäähdyttävä kiinnitettiin N_2 -linjaan reaktioseoksen saattamiseksi typpiatmosfäärin alle. Lisäksi kolviin kiinnitettiin tiivisteellinen lämpömittari ja paineentasausputkellinen tiputussuppilo. Kolvin lämpötila laskettiin $10\text{ }^\circ\text{C}$:een jäävesihauteella, ja kolviin lisättiin ensin trietyyliamiinia ja sitten etyyliklooriformiaattia liuotettuna DMF:iin hitaasti pisaroittain. Koolihapon ja etyyliklooriformiaatin seka-anhydridin muodostavan seoksen annettiin sekoittua 30 minuuttia huoneenlämmössä.

Sillä välin aminometyylipyreeni valmisteltiin toisessa kolvissa liuottamalla se DMF:iin ja lisäämällä kolviin trietyyliamiinia. Seoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä 30 minuuttia ja näin aminometyylipyreeni vapautettiin hydrokloridisuolastaan.

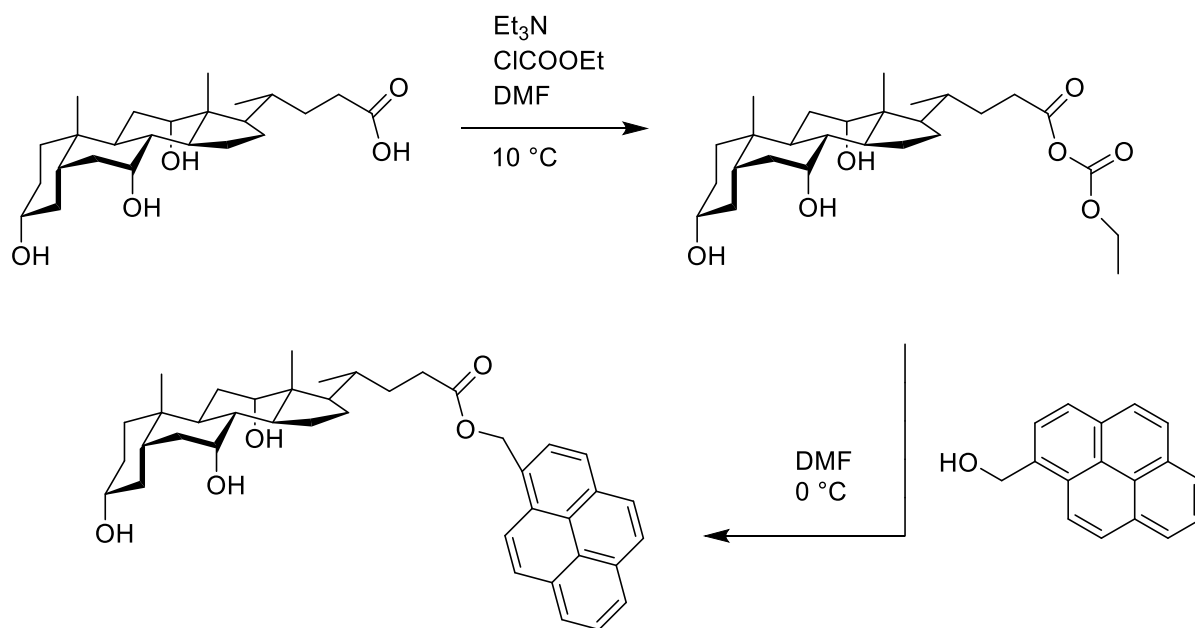
Koolihapon ja etyyliklooriformiaatin seka-anhydridin sisältämä kolvi jäähdytettiin $0\text{ }^\circ\text{C}$:een suola-jäähauteen avulla, minkä jälkeen aminometyylipyreeni lisättiin kolviin hitaasti pisaroittain 39 minuutin aikana. Lisäyksen jälkeen seoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä typpiatmosfäärin alla 116 tuntia.

Näin saadusta raakatuotteesta evaporoitiin liuotin pois pyöröhaihduttimella, minkä jälkeen raakatuote liuotettiin kloroformiin ja pestiin käyttäen vettä, HCl -liuosta ja kylläistä NaCl -liuosta. Pestystä raakatuotteesta mitattiin ^1H NMR-spektri, jonka perusteella todettiin

raakatuotteen sisältävän tuotteen lisäksi vielä epäpuhtauksia. Tuotteen puhdistamiseksi pylväskromatografialla etsittiin sopiva eluentti käyttäen ohutlevykromatografiaa, minkä jälkeen raakatuotteelle suoritettiin pylväskromatografinen puhdistus. Tuote puhdistettiin saostamalla se kloroformista. Tuotteen puhtaudesta varmistuttiin ^1H ja ^{13}C NMR-mittausten avulla (liitteet 1 ja 2). Tuotteen absorptio- ja emissiospektrit (kuva 21 ja 22) mitattiin UV-Vis-spektrofotometrillä ja fluoresenssispektrofotometrillä. Mittausparametrit ja näytteen valmistus on esitetty liitteessä 7. Lisäksi tuotteesta mitattiin massaspektri (liite 3).

8.2 Koolihapon metyylipyreeniesterin valmistaminen

Koolihapon metyylipyreeniesterin synteesireitti on esitetty kaaviossa 2.



Kaavio 2. Koolihapon metyylipyreeniesterin synteesireitti

Koolihapon metyylipyreeniesteri valmistettiin ja puhdistettiin vastaavalla tavalla kuin koolihapon *N*-metyylipyreeniamidi. Seoksen annettiin sekoittua huoneenlämmössä typpi-atmosfäärissä 93 tuntia.

Raakatuote puhdistettiin pylväskromatografisesti. Saatua tuotetta yritettiin saostaa liuottamalla se ensiksi metanoliin ja lisäämällä sitten pisaroinnain veteen. Muodostunut sakka oli kuitenkin niin

hienojakoista, ettei sitä saatu suodatettua. Tämän jälkeen tuote evaporoitiin kuivaksi ja puhdistettiin uudelleenkiteyttämällä se asetonitriilistä. Tuotteen puhtaudesta varmistuttiin ^1H ja ^{13}C NMR-mittausten avulla (liitteet 4 ja 5). Lisäksi tuotteesta mitattiin massaspektri (liite 6).

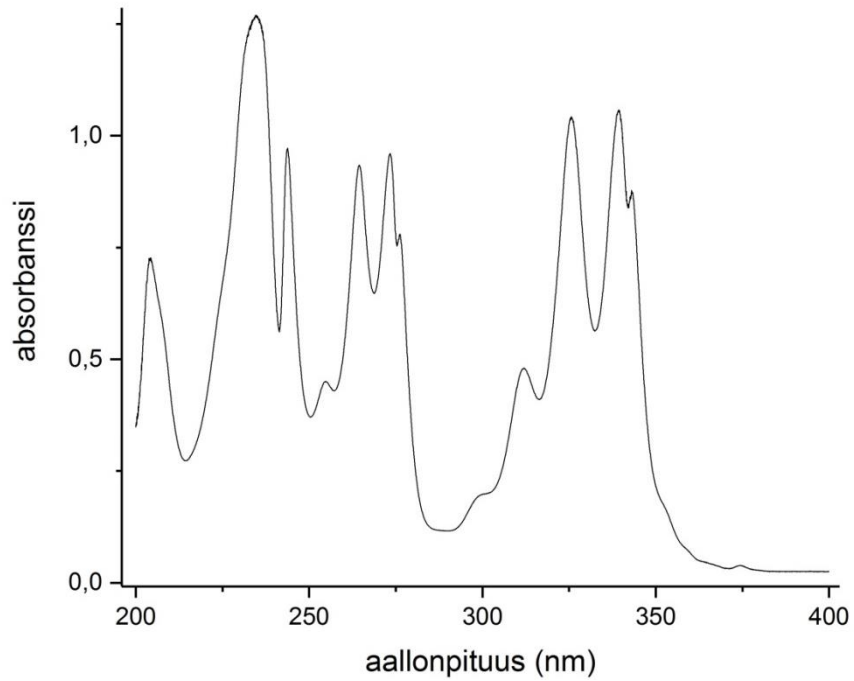
9 Tulokset ja niiden tarkastelu

Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidi

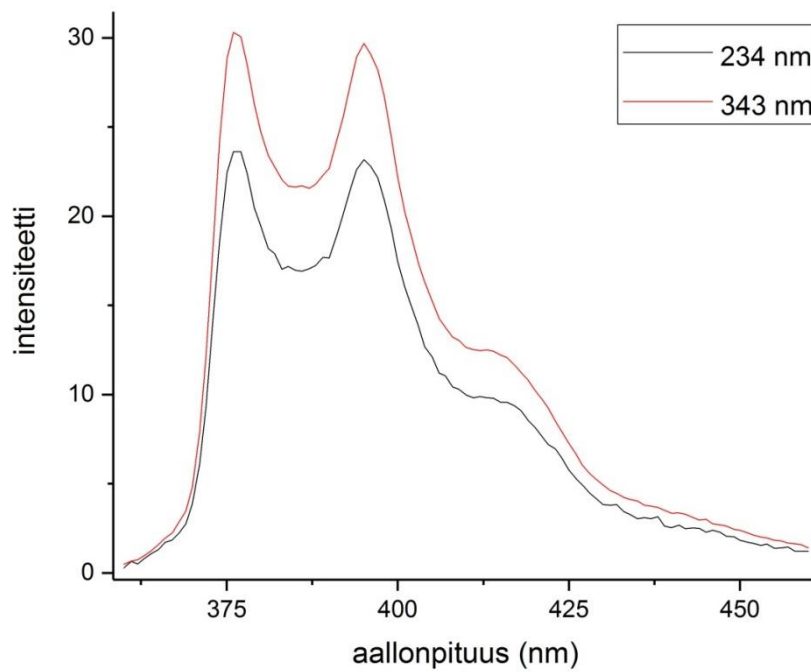
Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin teoreettinen saanto oli synteesiohjeen perusteella 3,1 g, ja todellinen saanto oli 0,3 g. Tuotteen saantoprosentti oli siten 11,2 %. Saantoprosenttia laski todennäköisesti se, että pylväspuhdistuksesta kerätyistä fraktioista vain fraktioiden 94-113 puhdistamista jatkettiin edelleen, vaikka fraktiot 84-93 sisälsivät myös tuotetta. Lisäksi, kun tuote saostettiin kloroformista, saattoi osa tuotteesta liueta kloroformiin.

Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin ^1H NMR-spektrissä (liite 1) nähdään amidiprotonin signaali arvolla $\delta = 5,55$ ppm. Tämä osoittaa amidin muodostuneen. Pyreenin aromaattisten vetyjen signaalit resonoivat välillä $\delta = 7,95 - 8,46$ ppm, ja pyreenin metyyliryhmän vetyjen signaalit resonoivat arvolla $\delta = 5,15$ ppm. Pyreenin aromaattisten protonien yhteenlasketut integraalit antavat arvoksi 10,1 teoreettisen arvon ollessa 9,0. Arvoa saattaa kasvattaa samalla alueella resonoiva jäännöskloroformin läsnäolo. Lisäksi ^{13}C NMR-spektrissä nähdään, että karbonyylihiili on siirtynyt yläkentälle amidin muodostuessa ja resonoii arvolla $\delta = 176,50$ ppm. Koolihapon karboksyylihapon karbonyylihiili resonoii arvolla $\delta \sim 178$ ppm.

Tuotteesta UV-Vis-spektrofotometrillä mitatun absorptiospektrin (kuva 21) perusteella päätettiin käyttää fluoresenssimittauksissa viritysaallonpituuksina 234 ja 343 nm. Fluoresenssispektrin (kuva 22) intensiteettejä verrattiin kirjallisuusarvoihin³⁴ (taulukko 3), ja todettiin, että koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin fluoresenssin emissiopiikit vastaavat hyvin pyreenille aiemmin mitattuja arvoja. Mittausten perusteella voidaan todeta, ettei koolihapon liittäminen pyreeniin juurikaan vaikuta sen fluoresoiviin ominaisuuksiin ja että koolihapon *N*-metyylipyreeniamidi voisi toimia fluoresoivana merkkiaineena.



Kuva 21. Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin UV-Vis-spektrofotometrillä mitattu absorptiospektri metanolissa.



Kuva 22. Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin fluoresenssispektrometrillä metanolissa mitatut emissiospektrit viritysaallonpituuksilla 234 ja 343 nm.

Taulukko 3. Fluoresenssipeikkien mitatut arvot ja kirjallisuusarvot³⁴

| Mittaus | Kirjallisuus |
|---------|--------------|
| 376 nm | 376 nm |
| 395 nm | 395 nm |
| 413 nm | ~ 415 nm |

Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin molekyyli­massa on 621,83 g/mol. Massaspektrissä (liite 3) havaitaan $[M + Na]^+$ -ioni m/z -arvolla 645,3. Vastaava teoreettinen m/z -arvo $[M + Na]^+$ -ionille on 644,4. Yhden yksikön virheen epä­illään johtuvan laitteen kalib­rointivirheestä, sillä virhe oli toistunut laitteen muissakin mittauksissa.

Koolihapon metyylipyreeniesteri

Koolihapon metyylipyreeniesterin teoreettinen saanto oli synte­si­ohjeeseen pohjautuen 1,3 g, ja todellinen saanto 0,1 g. Tuotteen saantoprosentti oli siten 4,5 %. Saantoprosenttia laski mahdollisesti muun muassa se, että pylväspuhdistuksesta kerätyistä fraktioista vain fraktioiden 42-81 puhdistamista jatkettiin edelleen, vaikka fraktiot 81-81 sisälsivät myös tuotetta. Lisäksi uudelleen­kiteytyksessä ja muissa vaiheissa on menetetty tuntematon määrä tuotetta.

Koolihapon metyylipyreeniesterin ¹H NMR-spektrissä (liite 4) nähdään, että pyreenin metyyliryhmän kahden protonin signaali on siirtynyt alakentälle esterisidoksen muodostuessa. Lisäksi ¹³C NMR-spektristä (liite 5) nähdään, että karbonyylihiili on siirtynyt yläkentälle esterin muodostuessa ja resonoi arvolla $\delta = 174,10$ ppm. Pyreenin aromaattisten protonien yhteenlaskettu integraali on 9,26 teoreettisen arvon ollessa 9,0.

Koolihapon metyylipyreeniesterin molekyyli­massa on 622,81 g/mol. Massaspektrissä (liite 6) havaitaan $[M + Na]^+$ -ioni m/z -arvolla 646,3. Vastaava teoreettinen m/z -arvo $[M + Na]^+$ -ionille on 645,4. Yhden yksikön virheen epä­illään johtuvan laitteen kalib­rointivirheestä, sillä virhe oli havaittu toistuvan muissakin laitteen mittauksissa.

10. Yhteenveto

Työssä pyrittiin valmistamaan koolihapon ja kahden pyreenijohdannaisen konjugaatit, joiden uskotaan voivan toimia kolesterolin merkkiaineena jatkotutkimuksissa. Koolihapon annettiin aluksi reagoida etyyliklooriformiaatin kanssa, jolloin muodostui aktiivi­vinen

anhydridivälituote, joka reagoidessaan aminometyylipyreenin tai 1-pyreenimetanolin kanssa muodosti halutut lopputuotteet. Molempien koolihaponmetyylipyreenijohdannaisten synteesi onnistui, ja tuotteet saatiin puhdistettua. Tuotteiden puhtaudesta varmistuttiin ^1H ja ^{13}C NMR-mittauksilla. Mitattujen massaspektrien perusteella molempien johdannaisten molekyyli-ionien massat vastasivat teoreettisia arvoja yhden yksikön virheellä, jonka epäillään johtuvan laitteen kalibraatiovirheestä. Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidista mitattu fluoresenssispektri vastasi pyreenistä aiemmin raportoituja fluoresenssisignaaleja. Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidi osoittautui siis fluoresoivilta ominaisuuksiltaan lupaavaksi kolesterolin merkkiaineeksi jatkotutkimuksia ajatellen.

11 Synteesiohjeet

11.1 Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidi

2,04 g (5 mmol) koolihappoa liuotettiin 42 ml:aan DMF:a ja lisättiin kolmikaulakolviin. Kolvi kiinnitettiin pystyjäähdyttäjään, joka liitettiin N_2 -linjaan. Lisäksi kolviin kiinnitettiin tiivisteellä varustettu lämpömittari ja paineentasausputkellinen tiputussuppilo. Reaktioseos jäähdytettiin $10\text{ }^\circ\text{C}$:een vesi-jäähauteella. Kolviin lisättiin ensin trietyyliamiinia 934 μl (6,7 mmol) ja sitten etyyliklooriformiaattia 640 μl (6,7 mmol) liuotettuna 3 ml:aan DMF:a hitaasti pisaroittain (n. 23 min). Seoksen annettiin sekoittua 30 minuuttia huoneenlämmössä.

1,79 g (6,7 mmol) aminometyylipyreenin HCl-suolaa liuotettiin 10 ml:aan DMF:a ja lisättiin 100 ml kolviin. Tähän kolviin lisättiin 934 μl trietyyliamiinia, ja seos jätettiin sekoittumaan huoneen lämpöön 30 minuutiksi.

Koolihapon ja etyyliklooriformiaatin seka-anhydridin sisältävä kolvi asetettiin suolajäähauteeseen ja kolviin lisättiin suolastaan vapautettu aminometyylipyreeni hitaasti pisaroittain (39 min) N_2 -virran alla. Seoksen annettiin sekoittua 116 tuntia huoneenlämmössä. Raakatuote siirrettiin 250 ml kolviin ja liuotin evaporoitiin pyöröhaihduttimen avulla. Raakatuote liuotettiin 100 ml:aan kloroformia ja pestiin käyttäen 2x75 ml vettä, 2x75 ml 0,1 M HCl, 2x75 ml kyll. NaCl-liuosta ja 2x75 ml vettä. Kloroformikerros kuivattiin käyttäen MgSO_4 :a ja liuotin haihdutettiin pyöröhaihduttimella. Tuote puhdistettiin ensin pylväskromatografian avulla (DCM:MeOH 90:10) ja sen jälkeen saostamalla sen kloroformista.

11.2 Koolihapon metyyliipyreeniesteri

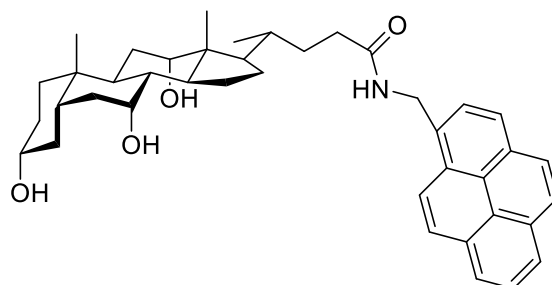
0,9 g (2,2 mmol) koolihappoa liuotettiin 30 ml:aan kuivaa DMF:a ja lisättiin kolmikaulakolviin, joka kiinnitettiin N₂-linjaan liitettyyn pystyjäähdyttäjään. Reaktioseos jäähdytettiin 10 °C:een vesi-jäähäuteella, ja kolviin lisättiin ensin trietyyliamiinia 411 µl (3,0 mmol) ja sitten etyyliklooriformiaattia 282 µl (3,0 mmol) liuotettuna 3 ml:aan DMF:a hitaasti pisaroittain. Tämän jälkeen seoksen annettiin sekoittua 30 minuuttia huoneenlämmössä.

0,5 g (2,2 mmol) 1-pyreenimetanolia liuotettiin 10 ml:aan DMF:a ja lisättiin epähuomiossa 20 ml dekantterilasiin. Dekantterilasiin lisättiin 411 µl trietyyliamiinia, ja seos jätettiin sekoittumaan huoneen lämpöön 30 minuutiksi. Tämä vaihe tulisi suorittaa työohjeen mukaisesti refluksointilaitteistoon kiinnitetyssä kolvissa

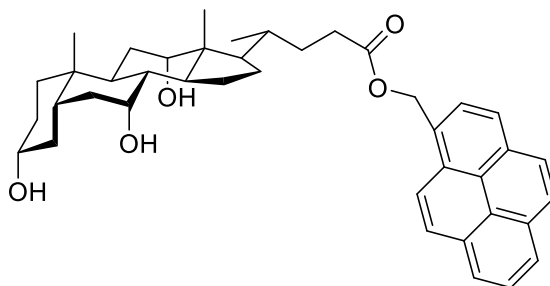
Koolihapon ja etyyliklooriformiaatin seka-anhydridin sisältävä kolvi asetettiin suola-jäähäuteeseen ja kolviin lisättiin 1-pyreenimetanoli hitaasti pisaroittain N₂-virran alla. Reaktioseoksen annettiin sekoittua 93 tuntia huoneenlämmössä typpiatmosfäärin alla. Liuotin evaporoitiin pyöröhaihduttimen avulla, minkä jälkeen raakatuote liuotettiin 75 ml:aan kloroformia ja pestiin käyttäen 2x50 ml vettä, 2x50 ml 0,1 M HCl, 2x50 ml kyll. NaCl-liuosta ja 2x50 ml vettä. Raakatuote puhdistettiin ensin pylväskromatografian avulla (DCM:MeOH 91:9) ja sen jälkeen uudelleen kiteyttämällä asetonitriilistä.

12. Valmistetut molekyylit

Kokeellisessa osassa valmistetut molekyylit on esitetty kuvissa 23 ja 24.



Kuva 23. Koolihapon *N*-metyyliipyreeniamidi



Kuva 24. Koolihapon metyyliipyreeniesteri

13. Kirjallisuusluettelo

1. Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3 painos, Springer, New York, NY, **2006**, ss. 1-7.
2. Luminescence - Real-life applications, <http://www.scienceclarified.com/everyday/Real-Life-Physics-Vol-3-Biology-Vol-1/Luminescence-Real-life-applications.html> (21.5.2018).
3. Ronda, C. ja Srivastava, A., Luminescence science and display materials, *Interface-Electrochem. Soc.*, **2006**, 15(1), 55-58.
4. The Chemistry of Glow Sticks, <http://www.compoundchem.com/2014/10/14/glowsticks/> (21.5.2018).
5. Glow in the Dark Paint and Powder Applications and Uses, <https://www.glonation.com/> (21.5.2018).
6. Eckert, W. G. ja James, S. H., *Interpretation of bloodstain evidence at crime scenes*, CRC press, **1998**, ss. 159-168.
7. Chemiluminescence, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chemiluminescence.jpg> (10.5.2018).
8. Atkins, P. ja Paula, J. D., *Atkins' physical chemistry*, 8 painos, Oxford University Press, Oxford, **2006**, ss. 430-438 ja ss. 481-496.

9. Albani, J. R., *Principles and applications of fluorescence spectroscopy*, Blackwell Science, Oxford, Ames, Iowa, **2007**, ss. 88-97.
10. Lavis, L. D. ja Raines, R. T., Bright building blocks for chemical biology, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, 9(4), 855.
11. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Mol. Biol. Cell*, **2008**, ss. 586-589.
12. Dividing Cell Fluorescence,
https://en.wikipedia.org/wiki/File:Dividing_Cell_Fluorescence.jpg (10.5.2018).
13. Lavis, L. D. ja Raines, R. T., Bright ideas for chemical biology, *ACS Chem. Biol.*, **2008**, 3(3), 142-155.
14. Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K. ja Nagano, T., Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127(13), 4888-4894.
15. Chatterjee, S. K.; Bhattacharya, M. ja Barlow, J. J., Glycosyltransferase and glycosidase activities in ovarian cancer patients, *Cancer Res.*, **1979**, 39(6 Part 1), 1943-1951.
16. Kamiya, M.; Kobayashi, H.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Bernardo, M.; Nagano, T.; Choyke, P. L. ja Urano, Y., An enzymatically activated fluorescence probe for targeted tumor imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129(13), 3918-3929.
17. Asanuma, D.; Sakabe, M.; Kamiya, M.; Yamamoto, K.; Hiratake, J.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Choyke, P. L.; Nagano, T.; Kobayashi, H. ja Urano, Y., Sensitive β -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours in vivo, *Nature Communications*, **2015**, 6, 6463.
18. Johnson, I. D., *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11 painos, Life Technologies Corporation, **2010**, ss. 57-65.
19. Hölttä-Vuori, M.; Uronen, R.; Repakova, J.; Salonen, E.; Vattulainen, I.; Panula, P.; Li, Z.; Bittman, R. ja Ikonen, E., BODIPY-cholesterol: A new tool to visualize sterol trafficking in living cells and organisms, *Traffic*, **2008**, 9(11), 1839-1849.

20. Yaohui, W.; Caina, J.; Guiqing, W.; Xinghui, Z.; Yanghe, L.; Aímiao, Q.; Aihui, L. ja Zhiliang, J., A sensitive fluorescence method for detection of *E. coli* using rhodamine 6G dyeing, *Luminescence*, **2015**, *31*(4), 972-977.
21. Alexa Fluor Dyes—Across the Spectrum,
<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alexa-fluor/alexa-fluor-dyes-across-the-spectrum.html> (6.5.2018).
22. Campbell, N. A.; Urry, L. A.; Cain, M. L.; Wasserman, S. A.; Minorsky, P. V. ja Reece, J. B., *Biology: a global approach*, 11 painos, global edition painos, Pearson, Boston, **2018**, a) 151-154 b) 447-454 c) 123-138.
23. Sahoo, H., Fluorescent labeling techniques in biomolecules: A flashback, *RSC Advances*, **2012**, *2*(18), 7017-7029.
24. Gronemeyer, T.; Godin, G. ja Johnsson, K., Adding value to fusion proteins through covalent labelling, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2005**, *16*(4), 453-458.
25. Guignet, E. G.; Hovius, R. ja Vogel, H., Reversible site-selective labeling of membrane proteins in live cells, *Nature Biotechnol.*, **2004**, *22*(4), 440.
26. Devaraj, N. K.; Weissleder, R. ja Hilderbrand, S. A., Tetrazine-based cycloadditions: Application to pretargeted live cell imaging, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*(12), 2297-2299.
27. Immunosytokemia, <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/immunosytokemia/2/> (10.5.2018).
28. Devlin, T. M., *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*, Wiley-Liss, **2002**, ss. 456-457.
29. Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H. ja Tsien, R. Y., The fluorescent toolbox for assessing protein location and function, *Science*, **2006**, *312*(5771), 217-224.
30. Crivat, G. ja Taraska, J. W., Imaging proteins inside cells with fluorescent tags, *Trends in Biotechnology*, **2012**, *30*, 8-16.

31. Immunofluoresenssi, <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/immunofluoresenssi/2/> (10.5.2018).
32. Schlumberger, M. C.; Müller, A. J.; Ehrbar, K.; Winnen, B.; Duss, I.; Stecher, B. ja Hardt, W., Real-time imaging of type III secretion: *salmonella* SipA injection into host cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2005**, *102*(35), 12548-12553.
33. Enhnen, A.; Kramer, W. ja Wess, G., Bile acids in drug discovery, *Drug Discovery Today*, **1998**, *3*, 409-418.
34. Kalyanasundaram, K. ja Thomas, J. K., Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*(7), 2039-2044.

Liitteet

Liite 1: Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin ¹H NMR-spektri

Liite 2: Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin ¹³C NMR-spektri

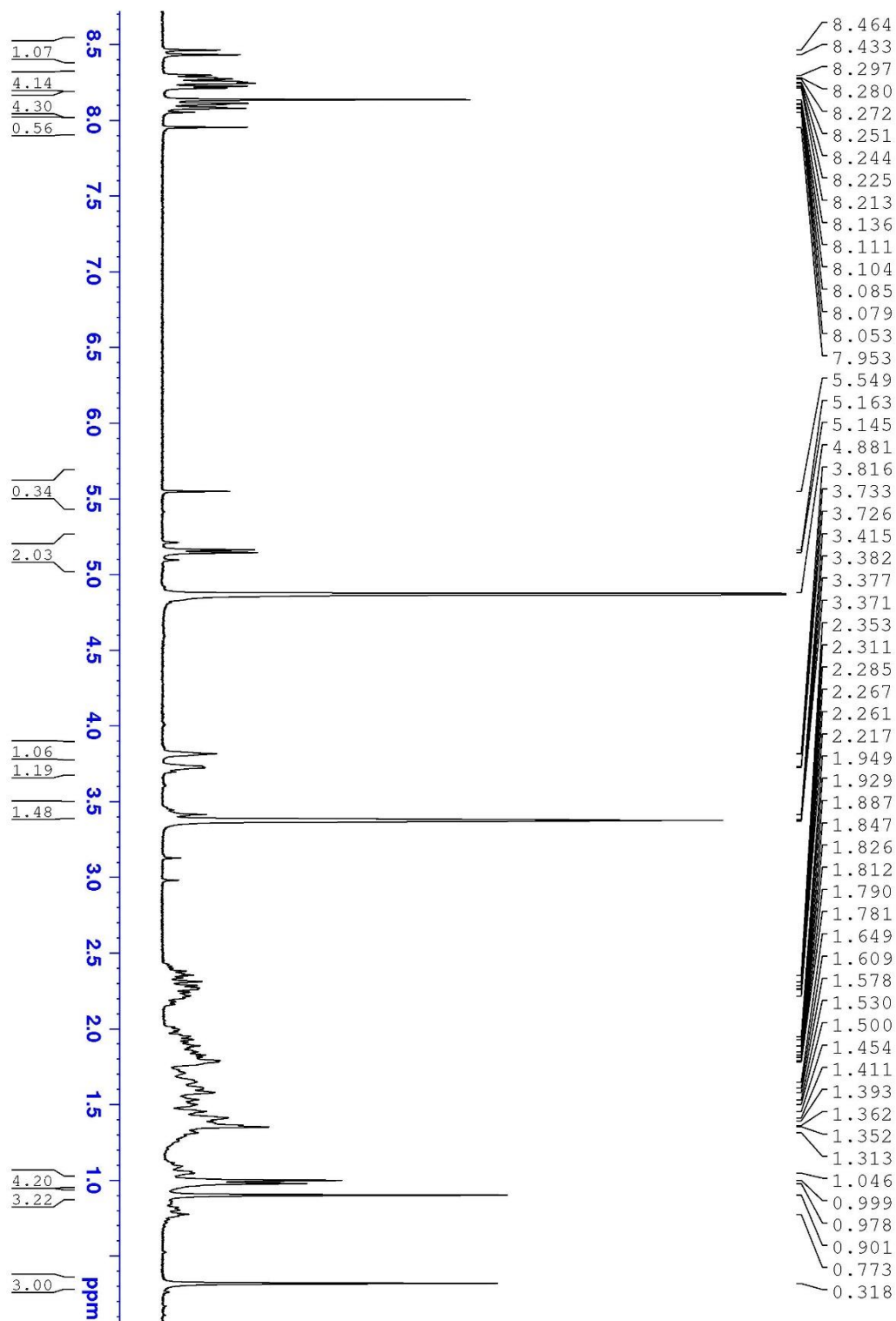
Liite 3: Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin massaspektri

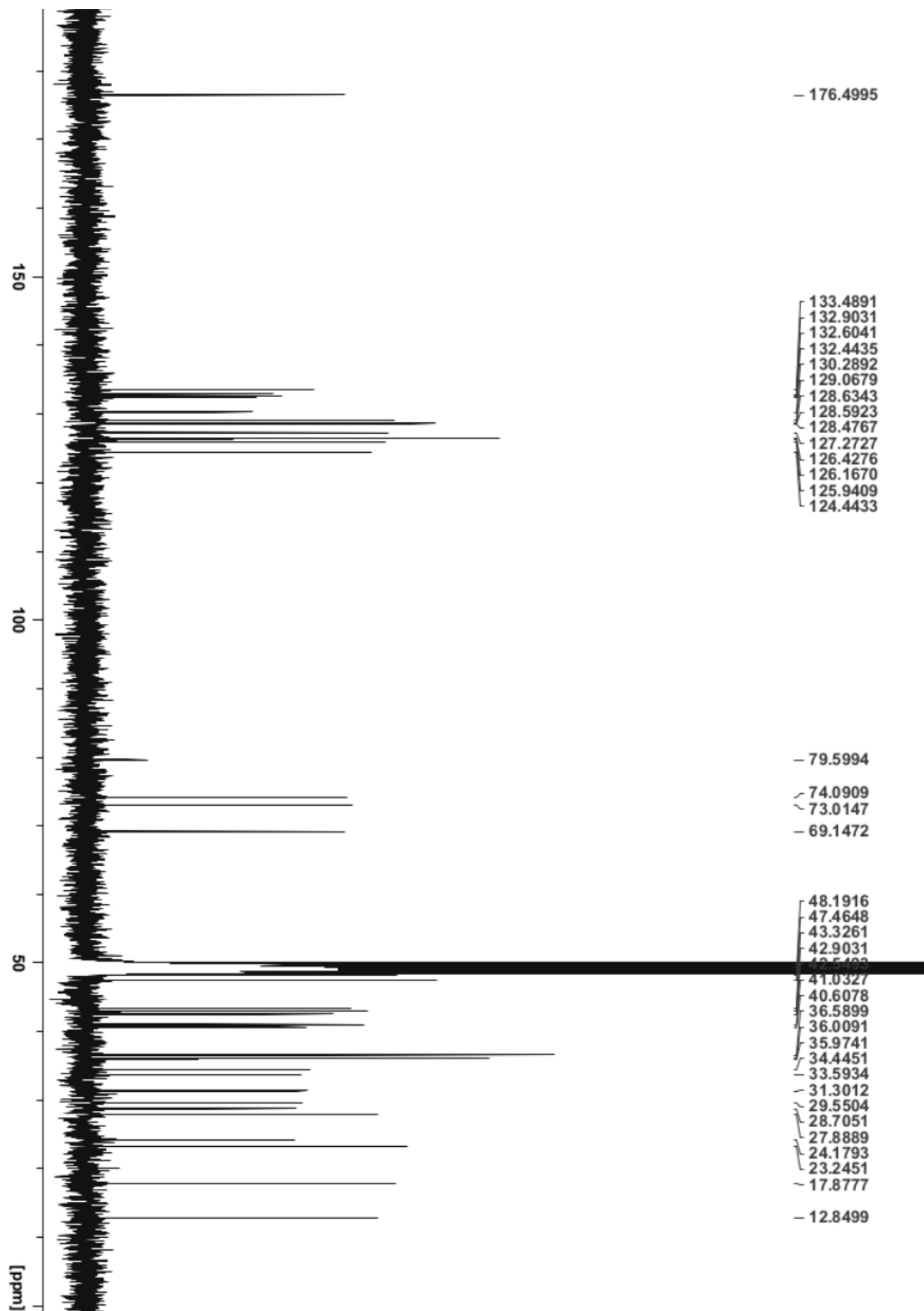
Liite 4: Koolihapon metyyliipyreeniesterin ¹H NMR-spektri

Liite 5: Koolihapon metyyliipyreeniesterin ¹³C NMR-spektri

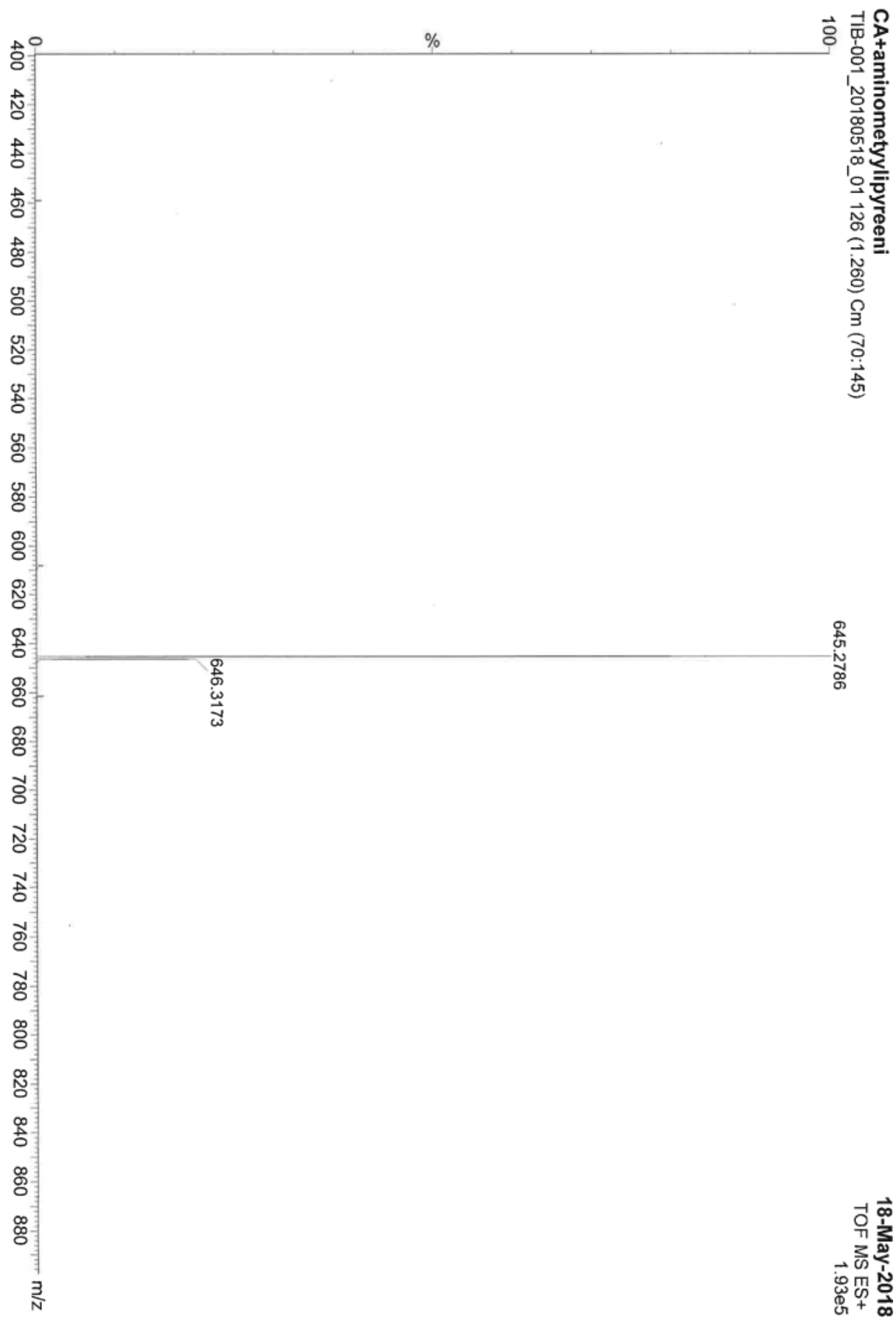
Liite 6: Koolihapon metyyliipyreeniesterin massaspektri

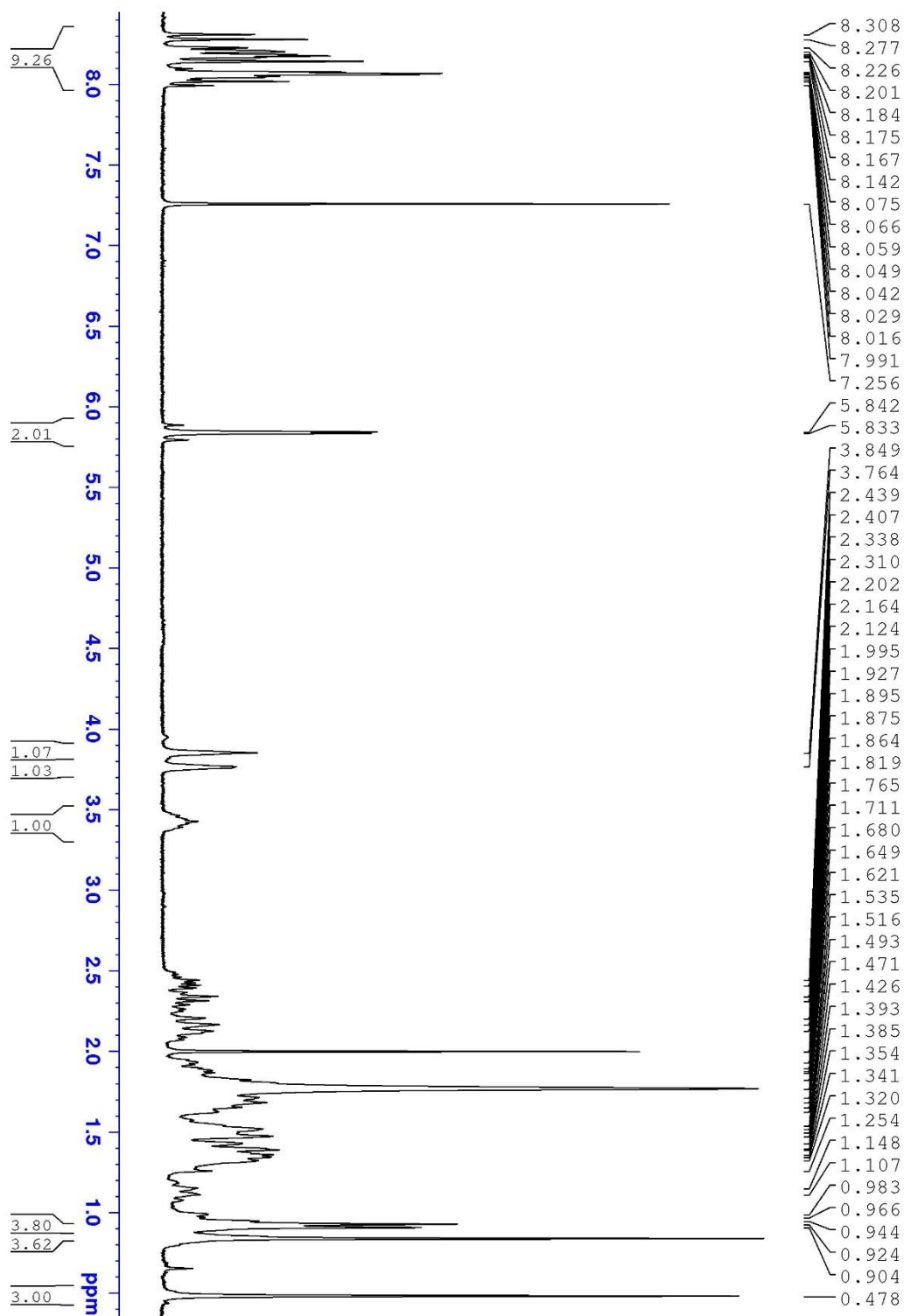
Liite 7: Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin absorptio- ja fluoresenssimittauksien näytteiden valmistus ja mittauksissa käytetyt parametrit

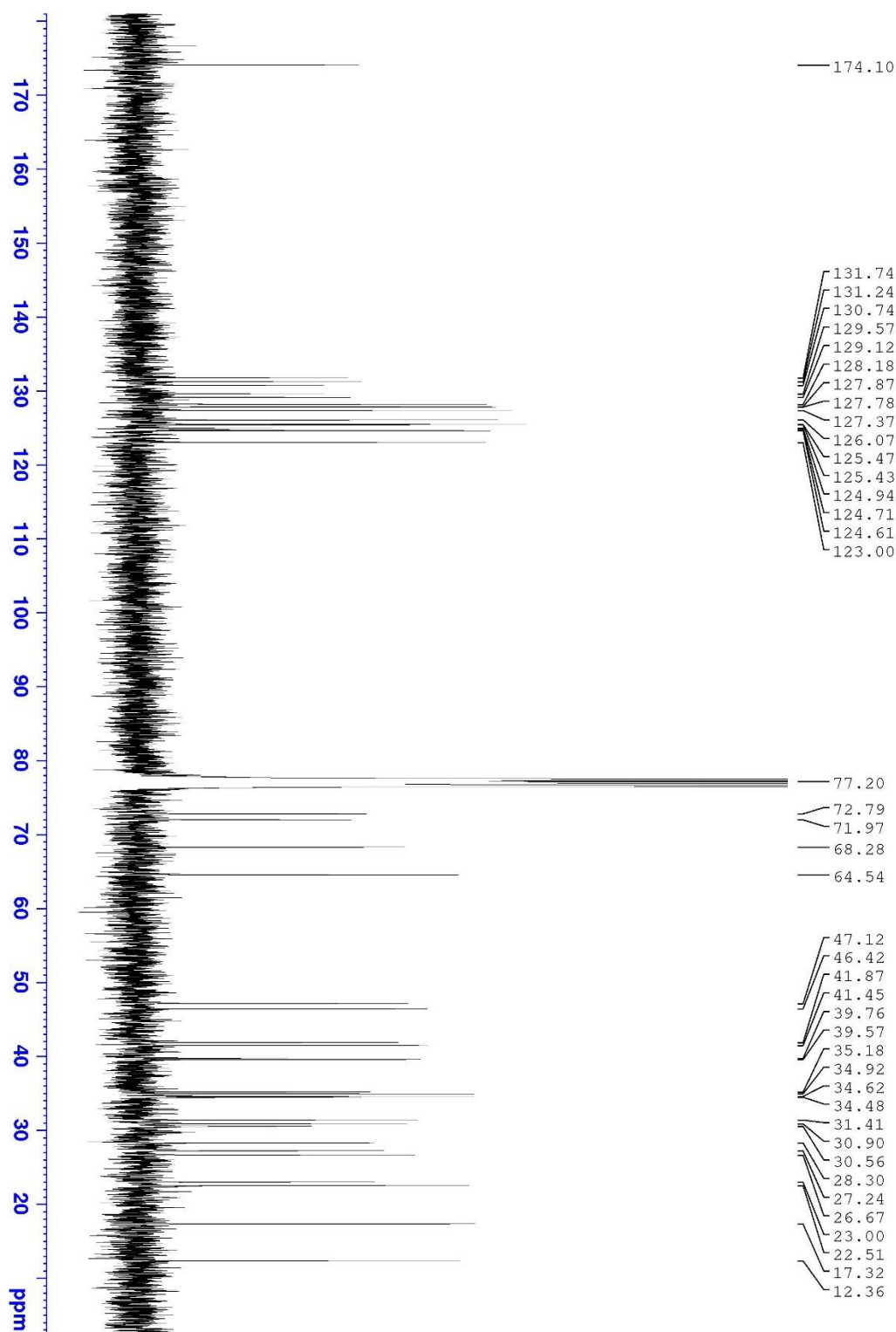
Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin ¹H NMR-spektri

Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin ^{13}C NMR-spektri

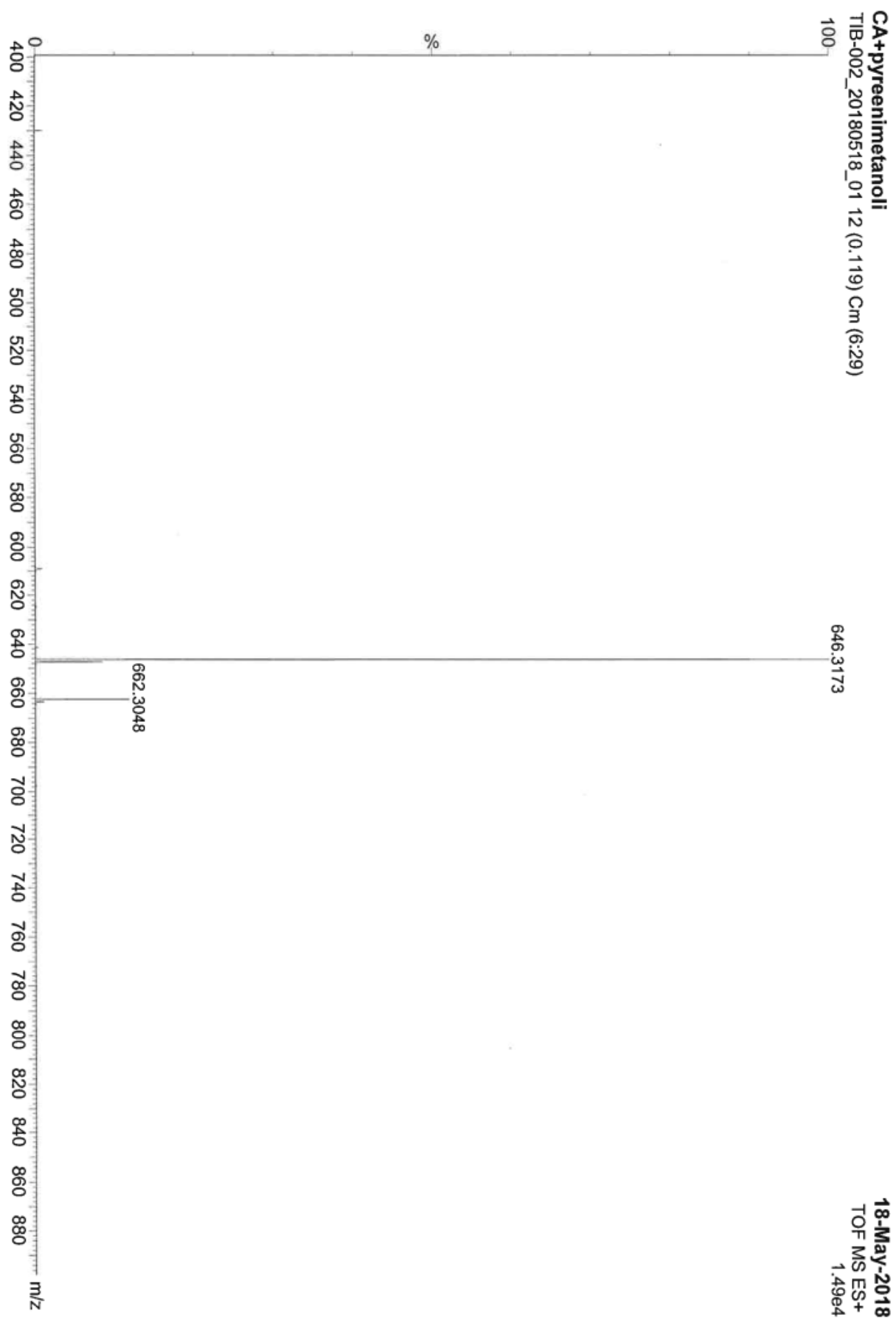
Koolihapon *N*-metyylipyreeniamidin massaspektri



Koolihapon metyylipyreeniesterin ^1H NMR-spektri

Koolihapon metyyliipyreeniesterin ^{13}C NMR-spektri

Koolihapon metyylipyreeniesterin massaspektri



Absorptio- ja fluoresenssimittaukset

Absorptiomittauksessa käytetty näyte valmistettiin liuottamalla n. 10 µg koolihapon *N*-metyylipyreeniamidia n. 4 ml:aan metanolia. Tästä liuoksesta otettiin vielä n. 1/5, joka laimennettiin samaan tilavuuteen metanolilla. Mittauksissa näyte asetettiin 10 mm kvartsikyvetiin.

Fluoresenssimittauksissa käytetty näyte valmistettiin ottamalla n. 0,2 ml absorptiomittauksissa käytetystä näytteestä kyvetiin ja laimentamalla se lisäämällä siihen metanolia.

Mittauksissa käytettiin fysikaalisen kemian oppilaslaboratorion (YF 312) spektrometrien laiteohjeita ja seuraavia muutettuja parametreja:

Absorptiomittauksessa käytetyt parametrit

Average time 0,1 s

Data interval 0,04 nm

Scan rate 30,00 nm/min

Fluoresenssimittauksissa käytetyt parametrit

Ex₁ 234,53 / Ex₂ 343,07 nm

Em 360 nm

Start 360 nm

Stop₁ 460 / Stop₂ 680 nm

Ex slit 5 nm

Em slit 5 nm

Scan rate 120 nm/min

Average time 0,5 s

PMT, detector voltage: "Low"

Volts 400 v