

**POCHODNE KUMARYNY DO ROLI MOLEKULARNYCH
SENSORÓW FLUORESCENCYJNYCH DO ZASTOSOWAŃ
W NAUKACH LIFE SCIENCE**

**COUMARIN DERIVATIVES FOR THE ROLE OF MOLECULAR
FLUORESCENT SENSORS FOR THE APPLICATION IN LIFE
SCIENCE**

Magdalena Czarna

Iwona Kamińska

Joanna Ortyl

Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki

Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

Katedra Biotechnologii i Chemii Fizycznej

ul. Warszawska 24

31-155 Kraków

e-mail: jortyl@chemia.pk.edu.pl

Abstract: Fluorescent spectroscopy is an important method in life science which has recently gained popularity. Fluorescent spectroscopy is widely used for example by the researches in the variety of biological structures, intercellular interactions, various kinds of biomolecules and also for understanding of the biochemical processes which take place inside the living organisms. For this purpose, an application of fluorescent sensors and searching for more efficient and more sensitive fluorophore for illustrating, labelling and detection, have become a developing trend in biochemistry, medicine, biology and also in many other chemistry researches. Nowadays, issues which are connected to fluorescence are mainly applied to the newest achievements in the field of fluorescent methods and measurement techniques and also to the development and applications of fluorescent probes, what is closely showed up in this article.

Keywords: coumarin, fluorescence, molecular sensor, molecular probes, fluorophore.

Wprowadzenie - rola fotochemii

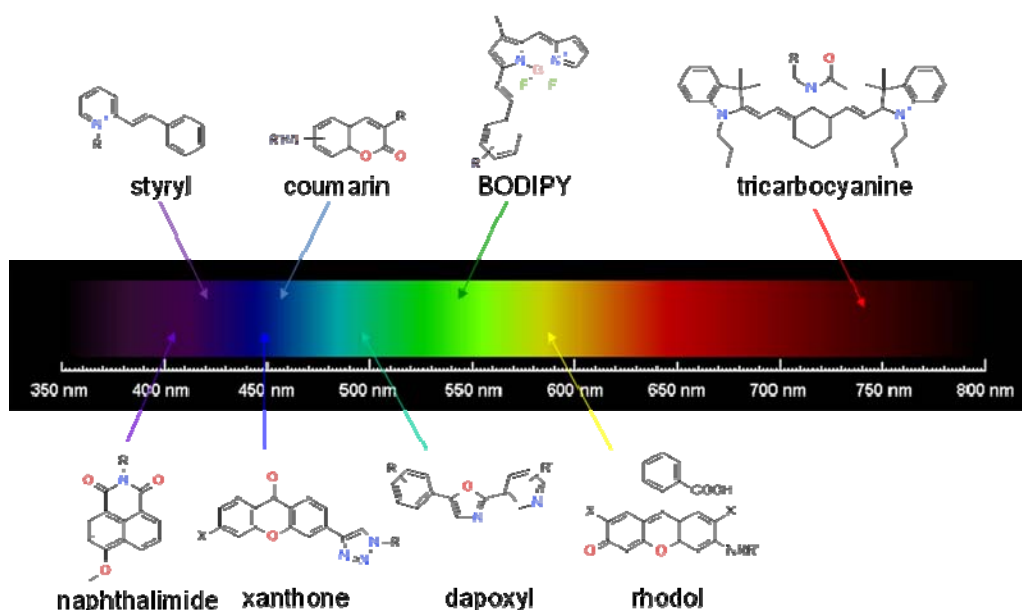
Światło odgrywa bardzo ważną rolę w naszym życiu. Bez niego nie można mówić o istnieniu roślin, zwierząt czy też samych ludzi. Z naukowego punktu widzenia, światłem nazywamy promieniowanie optyczne, czy też dokładniej fale elektromagnetyczne. Światło możliwe do zaobserwowania przez istotę ludzką jest widzialną częścią widma promieniowania elektromagnetycznego. Najczęstszą formą światła, z jaką możemy się spotkać każdego dnia, jest światło wywołane efektem termicznym i to właśnie ta forma przychodzi nam jako pierwsza do głowy kiedy myślimy o

światle [1]. Okazuje się jednak, że początkiem XX wieku dokonano przełomowego odkrycia i zaobserwowano występowanie zimnego światła, czyli zjawiska świetlnego wywołanego innym efektem niż termiczny. W świecie nauki okres ten był bardzo burzliwy i wprowadził mnóstwo nowych teorii na temat nowego zjawiska.

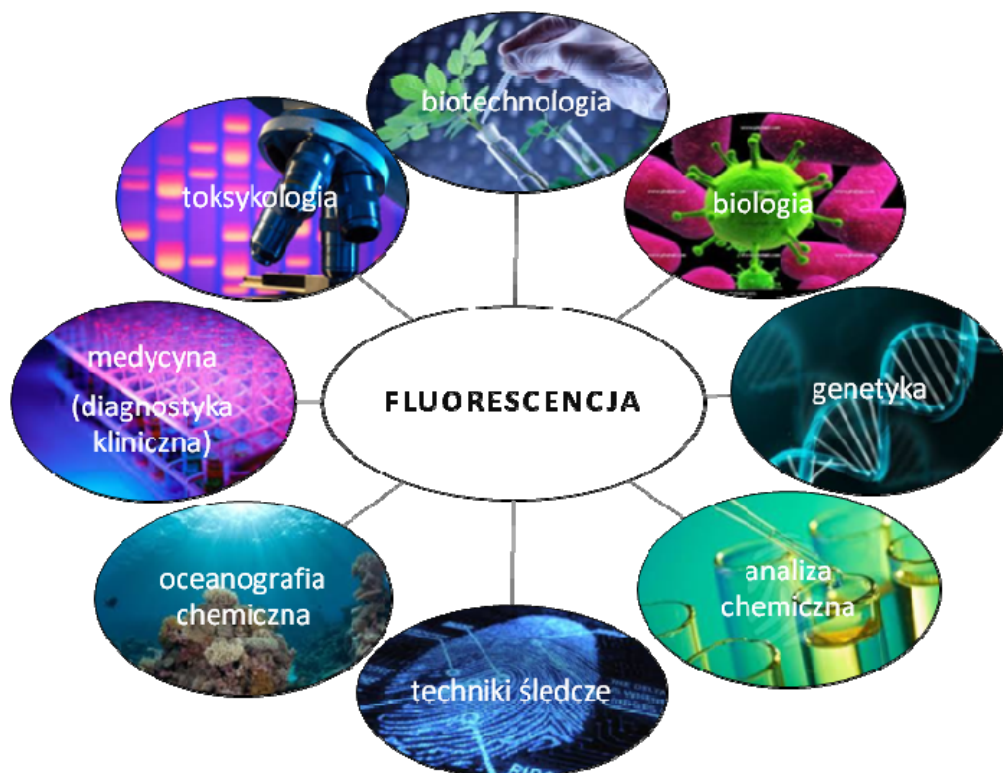
Do dnia dzisiejszego wiedza na temat procesów fotochemicznych uległa znacznemu poszerzeniu, jednakże ciągle wzbudza spore zainteresowanie wielu uczonych. Dzieje się tak przez wzgląd na możliwości, jakie daje nam fotochemia [2, 3]. Przykładowo więc, substancje charakteryzujące się występowaniem luminescencji znalazły zastosowanie w wielu

dziedzinach życia, dlatego ciągle poszukiwanie nowych związków wykazujących właściwości luminescencyjne oraz poznawanie mechanizmów towarzyszących zjawiskowi luminescencji wydaje się być oczywiste. Najlepszym dowodem na ogromny potencjał opisanego zjawiska są trzy Nagrody Nobla przyznane na przełomie ostatnich kilku lat, każda związana z procesami fotochemicznymi. W 2005 nagrodę taką w dziedzinie fizyki otrzymał John Lewis Hall wraz z Theodorem Hänschem za wkład w rozwój precyzyjnej spektroskopii laserowej. Następną Nagrodę Nobla tym razem w dziedzinie chemii przyznano trzy lata później trójce naukowców Martinowi Chalfiemu, Osamu Shimomurze i Rogerowi Tsienowi, za odkrycie i badania nad fluorescencyjną białkową sondą GFP (ang. *greenfluorescent protein*), która aktualnie znajduje zastosowanie w biologii molekularnej komórki [4]. W roku 2014 doceniona została praca naukowa Erica Betziga, Stefana W. Hella i Williama E. Moerner, którzy włożyli nieoceniony wkład naukowy w rozwój mikroskopii fluorescencyjnej wysokiej rozdzielczości [5]. Nie trudno więc zauważyć, że fotochemia jest dziedziną nauki ciągle ewoluującą i nieustannie wzbudzającą ciekawość. W świecie nauki ze zjawiskiem luminescencji związane jest również pojęcie sensorów

molekularnych, bądź sond molekularnych, czyli związków, których wyjątkowość polega na wiązaniu się w specyficzny sposób z innymi substancjami, które można wykryć przez wzgląd na charakterystyczne właściwości sensora. W momencie kiedy połączono zjawisko fluorescencji z sondami, otrzymano związki, które aktualnie znane są jako molekularne sensory fluorescencyjne czyli związki, które po wzbudzeniu charakteryzują się emisją promieniowania, co jest właściwością pozwalającą na identyfikowanie ich samych i substancji z nimi połączonych [5] (rys. 2). Sensory fluorescencyjne stanowią cenne źródło zainteresowań wśród chemików, biologów, biochemików oraz biotechnologów. Wynika to z faktu, iż układy przeznaczone do roli sond fluorescencyjnych, stosowane są aktualnie do oznaczania i wykrywania białek, kwasów nukleinowych, zaś w medycynie wykorzystywane do identyfikacji komórek rakowych natomiast w świecie chemii do monitorowania procesów fotopolimeryzacji [6]. Tak jak w przypadku samej fotochemii, tak też w przypadku sond fluorescencyjnych liczba możliwych zastosowań jest ogromna, dlatego badanie właściwości różnych związków pod tym kątem jest dla wielu chemików niezmiernie ciekawe i niosące nadzieje na nowe odkrycia w dziedzinie fotochemii (rys. 2).



Rys. 1. Przykłady fluorescencyjnych sond molekularnych różniących się zakresem emisji.



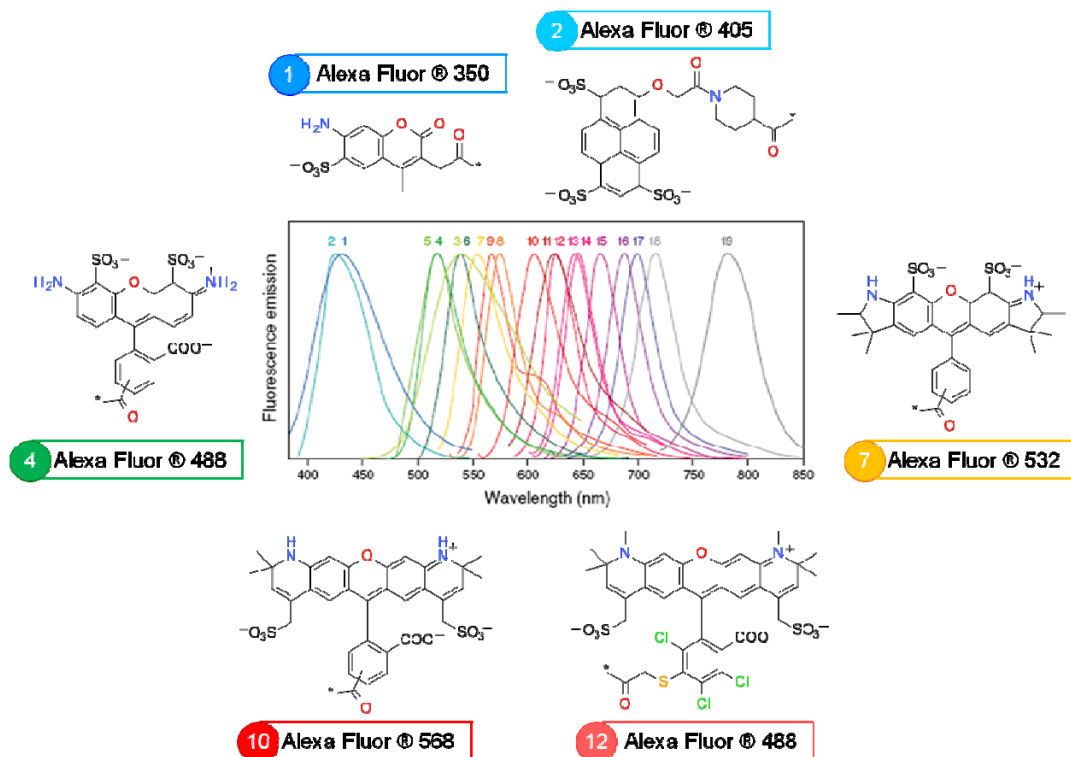
Rys. 2. Zastosowanie zjawiska fluorescencji.

Molekularne sensory fluorescencyjne

Molekularne sensory fluorescencyjne odgrywają bardzo ważną rolę w świecie nauki i stały się potężnym narzędziem oferującym możliwość poznania informacji na temat lokalizacji submolekularnej, budowy komórek czy zrozumienia procesów biochemicznych zachodzących wewnątrz organizmu. Zainteresowanie tego typu sensorami molekularnymi nieustannie rośnie ze względu na ich uniwersalność i dużą czułość, jaka niezbędna jest szczególnie w badaniach biologicznych i biochemicznych [7].

Mechanizm działania takiego sensora polega na tworzeniu się wiązania pomiędzy fluoroforem, a więc cząsteczką zdolną do fluorescencji, a inną molekułą, taką jak białko czy kwas nukleinowy. Barwiąc w ten sposób poszczególne organella komórkowe przy użyciu różnych barwników fluorescencyjnych uzyskujemy w momencie naświetlenia kolorowy obraz ukazujący szczegółową budowę wewnętrzną. Bardzo często przy pomocy fluorescencyjnych sensorów znakowane są

przeciwiała, które później używane są jako specyficzne sondy do wykrywania określonego celu. Ponadto układy takie znalazły też zastosowanie w cytometrii przepływowej, mikroskopach fluorescencyjnych i fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH). Przy użyciu różnego rodzaju technologii do dnia dzisiejszego udało się uzyskać dużą liczbę sond fluorescencyjnych, które obecnie dostępne są jako produkty handlowe. Firmą oferującą szeroką paletę tych związków jest Life Technologies Corporation. O wyborze określonego sensora/sondy molekularnej decyduje tylko i wyłącznie rodzaj eksperymentu jaki ma być wykonany i sprzęt jaki zostanie użyty do oznaczenia. Alexa Fluor jest charakterystyczną dla tej firmy rodziną związków, która została stworzona do znakowania komórek i tkanek w mikroskopii świetlnej i biologii molekularnej. Numery występujące w nazwie substancji wskazują na maksimum ekscytacji charakterystyczne dla każdego z nich. Poniżej zaprezentowano wybrane fluorofory znajdujące się w ofercie firmy rys. 3.



Rys. 3. Wybrane fluorofory firmy Life Technologies Corporation [8].

Wybrane sondy – zastosowanie

Spośród wszystkich barwników umieszczonych w tabeli 1 warto bliżej przyglądać się wybranym strukturom. Związkiem, który osiągnął wielką popularność ostatnimi czasy jest zielone białko fluorescencji (GFP-*Green Fluorescent Protein*) czyli barwnik pochodzenia naturalnego. Jak większość barwników fluorescencyjnych wykorzystywany jest w biologii molekularnej do znakowania komórek, jednak odróżnia go brak toksyczności w stosunku do organizmów żywych, co pozwala na śledzenie procesów biologicznych *in vivo*. Na specyficzne właściwości tego związku wpływ miały również liczne modyfikacje, związane z wprowadzeniem mutacji, co doprowadziło do powstania nowych pochodnych (np. CFP-*CyanFluorescent Protein*, RFP-*Red Fluorescent Protein*) charakteryzujących się zwiększoną wydajnością fluorescencji czy też możliwością emisji przy różnych długościach fali. Ogromną zaletą tych związków jest też możliwość syntezowania GFP bezpośrednio w komórkach organizmu będącego celem badania [9, 10].

Fluoresceina jest kolejną substancją charakteryzującą się zielonym zabarwieniem. Maksimum absorpcji dla tego związku wynosi 494 nm, emisji zaś 521 nm. Pochodne fluoresceiny są najpopularniejszymi barwnikami, ze względu na swoje właściwości absorpcyjne, doskonałą wydajność kwantową i dobrą rozpuszczalność w wodzie. Jako barwnik służy między innymi do oznaczania komórek w mikroskopii fluorescencyjnej lub jako sonda fluorescencyjna w hybrydyzacji *in situ* [11]. Dodatkowo fluorescencja tych związków jest wrażliwa na zmiany pH zachodzące w jej otoczeniu, a sprzężenie fluoresceiny z biopolimerami powoduje wygaszanie fluorescencji. Sól sodowa fluoresceiny wykorzystywana jest w dziedzinie okulistyki i optometryki, do rozpoznania nieprawidłowości takich jak owrzodzenie rogówki, oderwanie rogówki czy opryszczkowe zakażenie rogówki. Po zastosowaniu dożylnym bądź doustnym może służyć w angiografii do zdiagnozowania zaburzeń naczyniowych, takich jak choroba plamki żółtej, zwyrodnienie siatkówki czy nowotworów wewnątrzgałkowych. W bardzo małych stężeniach fluoresceina wykorzystywana była również podczas operacji do

rozpoznania wad komory serca. Ciekawe jest również zastosowanie z innej dziedziny, nie związanej z medycyną czy biologią komórki. Podczas II wojny światowej, każdy członek załogi niemieckich samolotów wyposażony był w mały pojemnik z fluoresceiną. W momencie

zestrzelenia samolotu nad obszarem wód, osoby którym udało się uratować uwalniały barwnik, który rozpuszczał się w wodzie i tworzył na jej powierzchni fluoryzująca „plamę” tym samym zwiększając swoje szanse na przetrwanie [12].

Tab 1. Zestawienie wybranych fluoroforów firmy Life Technologies Corporation i ich ogólna charakterystyka spektroskopowa.

Lp.	Fluorofor Alexa Fluor	Maksimum absorpcji [nm]*	Maksimum emisji [nm]*	Kolor emisji**
1.	Alexa Fluor 350	346	442	niebieski
2.	Alexa Fluor 405	402	421	niebieski
3.	Alexa Fluor 430	434	539	Żółto-zielony
4.	Alexa Fluor 488	495	519	zielony
5.	Alexa Fluor 514	518	540	zielony
6.	Alexa Fluor 532	531	554	żółty
7.	Alexa Fluor 546	556	573	pomarańczowy
8.	Alexa Fluor 555	555	565	pomarańczowy
9.	Alexa Fluor 568	578	603	czerwono-pomarańczowy
10.	Alexa Fluor 594	590	617	czerwony
11.	Alexa Fluor 610	612	628	czerwony
12.	Alexa Fluor 633	632	647	daleka podczerwień
13.	Alexa Fluor 635	633	647	daleka podczerwień
14.	Alexa Fluor 647	650	668	daleka podczerwień
15.	Alexa Fluor 660	663	690	bliska podczerwień
16.	Alexa Fluor 680	679	702	bliska podczerwień
17.	Alexa Fluor 700	702	723	bliska podczerwień
18.	Alexa Fluor 750	749	775	bliska podczerwień
19.	Alexa Fluor 790	782	805	bliska podczerwień

*Przybliżone wartości maksimum absorpcji i emisji

**Typowy kolor emisji obserwowany przez okular konwencjonalnego mikroskopu fluorescencyjnego z zastosowaniem odpowiednich filtrów

Do tak zwanych zielonych sensorów fluorescencyjnych zaliczyć można również Alexa Fluor[®] 488 (rys. 3). Barwnik ten służy do wytwarzania stabilnego obrazu zarówno w obrazowaniu jak i cytometrii przepływowej ze względu na niewrażliwość na zmiany pH. W związku z wysoką wydajnością kwantową fluorescencji oraz wysoką fotostabilnością przy użyciu tych związków możliwe jest oznaczanie struktur z bardzo dużą wrażliwością. Dzięki temu układy te znalazły zastosowanie w śledzeniu komórek nerwowych i innych mikroskopowych struktur [8].

Kumaryny jako sondy fluorescencyjne

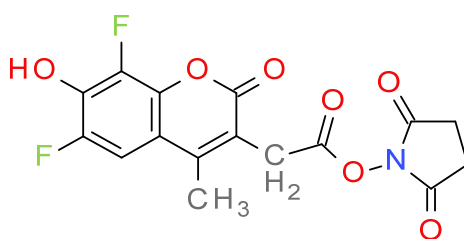
Pochodne 2H-1-benzopiran-2-onu posiadają interesujące właściwości spektroskopowe, co zostało zgłębione przez dwóch niezależnych naukowców, Wheelocka i Bagchiego.

Charakterystyka absorpcji i fluorescencji kumaryny zmienia się wraz z różnorodnością grup funkcyjnych przyłączonych do jej pierścienia. Wheelock udowodnił, że wprowadzenie do pierścienia kumarynowego w pozycję 4, 6 lub 7 ugrupowania elektroakceptorowego lub podstawienie w pozycję 3 ugrupowania elektronodonorowego jest odpowiedzialne za zjawisko przesunięcia batochromowego zarówno widma fluorescencji fal jak i widma absorpcji [13, 14]. Obaj uczeni udowodnili też, że wprowadzenie ugrupowania hydroksylowego, które wykazują właściwości auksochromowe, również wpływa na charakterystykę absorpcji. Kumaryny znane są również jako związki posiadające duże przesunięcie Stokesa, czyli przesunięcie maksimum pasma absorpcji względem pasma emisji. Powyższe właściwości zadecydowały o tym że pochodne kumaryny wykorzystywane są

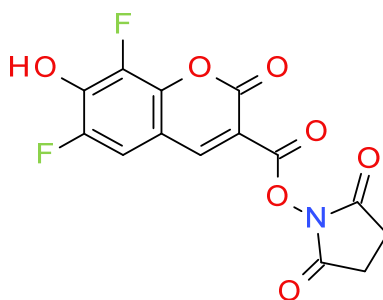
jako sensory fluorescencyjne [15, 16]. Charakterystyczne dla nich jest to, że są to przeważnie związki chemiczne absorbujące i fluoryzujące w krótszych długościach fali w zakresie ultrafioletu. Najczęściej można się spotkać z sensorami fluoryzującymi w kolorze zielonym, czerwonym, żółtym czyli z zakresu widzialnego. Barwniki z krótszego zakresu wykazujące aktywność do związków aminopochodnych są rzadziej stosowane do tworzenia biokoniuatów ze względu na to, że są to związki o wyższej energii w związku z czym istnieje większe prawdopodobieństwo spowodowania fotouszkodzeń cząsteczek biologicznych. Jednakże w pewnych zastosowaniach, pochodne te wykazują unikatowe właściwości, które są nie do zastąpienia, a ich atutem jest niebieska barwa emisji, która w połączeniu z innymi kolorami tworzy mocny kontrast, co ułatwia rozróżnienie poszczególnych struktur komórki [17]. Wśród produktów handlowych polecanych do tworzenia biokoniuatów wykazujących jasnoniebieską fluorescencję zaliczyć możemy m.in. takie pochodne kumaryny jak Alexa Fluor® 350 czy Alexa Fluor® 405 (ryc 3). Alexa Fluor® 350 charakteryzuje się widmem fluorescencji o jasno niebieskiej barwie emisji. Związek ten doskonale nadaje się do bezpośredniego obrazowania większej ilości celów i używany jest głównie do oznaczania przeciwciał,

tworzenia koniuatów z peptydami czy też kwasami nukleinowymi. Kolejna pochodna kumaryny stanowiąca barwnik o nazwie Alexa Fluor® 405 wykorzystywana jest bardzo często jako barwnik fluorescencyjny w cytometrii przepływowej. Należy też do grupy związków pozwalających na uwidocznienie szczegółów w budowie komórki, czego przykładem może być obraz wypustek neuronów barwiony właśnie tą substancją. Dodatkowo częstym zastosowaniem związku jest używanie jego przeciwciał do wzmacniania sygnału w mikroskopii świetlnej, co w połączeniu ze standardowymi metodami pozwala wygenerować sygnał o większej trwałości. Tak jak poprzedni barwnik, również Alexa Fluor® 405 może być sprzęgany z białkami czy przeciwciałami i służyć do wykrywania i oznaczania komórek [8].

Innymi pochodnymi kumaryn są np. barwniki Marina Blue® i Pacific Blue™ i należą do 6,8-difluoro-7-hydroksykumaryn (rys. 4, 5). Tak jak poprzednicy, również charakteryzują się jasnoniebieską barwą emisji, co jest związane z widmem fluorescencji posiadającym maksimum intensywności przy 460 nm, różnią się jednak pod względem właściwości. Obydwa barwniki stosowane są w mikroskopach fluorescencyjnych i cytometrii przepływowej i tak jak większość tych barwników służą do oznaczania komórek [8].



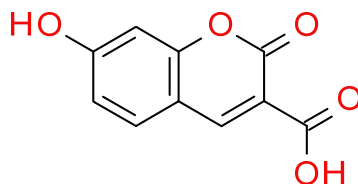
Rys. 4. Marina Blue®.



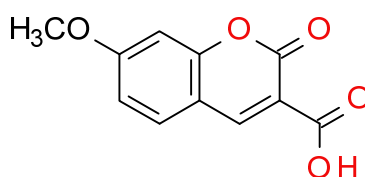
Ryc 5. Pacific Blue™.

Wśród innych barwników fluorescencyjnych pochodzenia kumarynowego wyróżnia się również hydroksypochodne i alkooksypochodne kumaryny. Hydroksypochodne (np. H185, rys.

6) kumaryny są o tyle charakterystyczne, że ich właściwości spektralne są wrażliwe na zmiany pH, czego nie obserwuje się wśród metoksypochodnych (np. M1420MP rys. 7).



Rys. 6. 7-hydroksy-3-karboksykumaryna (H185).



Rys. 7. 7-metoksy-3-karboksykumaryna (M1420MP).

Podsumowanie

Obszar rozwoju technik wykorzystujących zjawisko fluorescencji ciągle stopniowo poszerza się, zarówno w podstawowych zagadnieniach jak i praktycznych zastosowaniach np. w analizie chemicznej, w biologii, w medycynie czy w przemyśle. Zastosowanie zjawiska fluorescencji w wielu dziedzinach nauki umożliwił rozwój zaawansowanej aparatury do pomiarów widm fluorescencji oraz zaawansowanych źródeł światła (np. laserów). Analiza widm fluorescencyjnych dostarcza szereg ciekawych informacji dotyczących m.in., struktury przestrzennej badanych związków np. białek, mechanizmów reakcji, składu badanej

próbki, wzajemnego oddziaływania cząsteczek znajdujących się w roztworze, itp. Zjawisko fluorescencji jest stosowane w fizycznych, chemicznych, biologicznych i medycznych naukach jako narzędzie do analizy, wizualizacji, śledzenia zmian w środowisku reakcji itp. Związki wykazujące fluorescencję mogą być używane nie tylko do obrazowania fluorescencyjnego, ale także jako sondy, wskaźniki, czujniki, które dostarczają informacji o strukturze i dynamice materii lub żywych układów. Zjawisko fluorescencji, wyjaśniając wiele procesów zachodzących w mikro i makroświecie, stwarza ogromne możliwości w wielu dziedzinach nauki, stając się w ten sposób cennym narzędziem badawczym.

Literatura

1. Suppan, P., *Chemia i światło*, Warszawa, 1981, PWN.
2. Baltrop, J.A., Coyle, J.D., *Fotochemia*, Warszawa, 1987, PWN.
3. Simons, J.P., *Fotochemia i spektroskopia*, Warszawa, 1976, PWN.
4. Nakabayashi, T., Wang, H., Kinjo, M., Application of fluorescence lifetime imaging of enhanced green fluorescent protein to intracellular pH measurements, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, 7, pp. 668-670.
5. 6. Yinan, W., Yuanzong, L., Wenbao, C., Application of Fluorescence Resonance Energy Transfer Technique in Bioanalysis, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1998, 04, 027.
6. Pączkowski, J., Sondy fluorescencyjne jako narzędzie badawcze w chemii polimerów, *Polimery*, 2005, 50 (7-8), s. 520-529.

7. Scully A.D., Ostler, R.B., Phillips, D., Neill, P.O., Application of fluorescence lifetime imaging microscopy to the investigation of intracellular PDT mechanisms, *Bioimaging*, 1997, 5 (1), pp. 9-18.
8. <http://www.lifetechnologies.com/> (dostęp 2.02.2015).
9. Tsien R.Y., The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, 67, pp. 509-544.
10. Chalfie, M., Green fluorescent protein, *Photochemistry and Photobiology*, 1995, 62, 4, pp. 651-656.
11. Noga, E.J., Udomukusonsri, P., Fluorescein, A Rapid, Sensitive, Nonlethal Method for Detecting Skin Ulceration in Fish, *Vet Pathol*, 2002, 39, pp.726–731.
12. Mathew, T., Kundan, S., i in., Multiple Muscular Ventricular Septal Defects: Use of Fluorescein Dye to Identify Residual Defects, *Ann Thorac Surg.*, 2014, 97, pp. 27–28.
13. Wheelock, Ch.E., The Fluorescence of Some Coumarins¹, *Journal of the American Chemical Society*, 1959, 81, p. 1348-1352.
14. Raju, B., Varadarajan, T.S., Spectroscopic studies of 7-diethylamino-3-styrylcoumarins, *J. Photochem. Photobio. A.*, 1995, 85, 3, pp. 263-267.
15. Chen, K., Guo, Y., Lu, Z. Yang, B., Shi, Z., Novel coumarin-based fluorescent probe for selective detection of bisulfite anion in water, *Chin. J. Chem.*, 2010, 28, 1, pp. 55-60.
16. Jung, H.S., Kwon, P.S., Lee, J.W., Kim, J.I., Hong, C.S., Kim, J.W., Yan, S., Lee, J.Y., Coumarin-derived Cu²⁺-selective fluorescence sensor:synthesis, mechanisms, and applications in living cells, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 5, pp. 2008-2012.
17. Li J., Lin H., Cai Z., Lin, H. (2009). A novel coumarin-based switching-on fluorescent andcolorimetric sensor for F⁻. *J. Lumin.*, 129, 5, pp. 501-505.

Praca współfinansowana w ramach projektów „Bioinżynier chemiczny (BINC)” w ramach POKL 4.1.2 „Zwiększenie liczby absolwentów kierunków o kluczowym znaczeniu dla gospodarki opartej na wiedzy” umowa nr POKL.04.01.02-00-217/11-00 oraz w ramach projektu LIDER Narodowego Centrum Badan i Rozwoju (nr umowy LIDER/014/471/L-4/12/NCBR/2013)