



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 지 연 교수 지도
석사학위 청구논문

응집유도발광현상과 분자회전제한을
통한 신호증폭성 형광물질의 개발

2024

성신여자대학교 대학원
미래응용과학학과
김 은 지

응집유도발광현상과 분자회전제한을
통한 신호증폭성 형광물질의 개발

이 지 연 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2023년 11월

성신여자대학교 대학원


미래응용과학학과

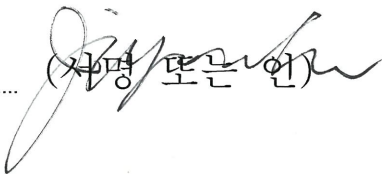
김 은 지

인 준 서

김은지의 석사학위 논문으로 인준함

2023년 11월

심사위원장 채 정 현 (서명 또는 인) 

심사위원 이 지 연 (서명 또는 인) 

심사위원 임 동 현 (서명 또는 인) 

성신여자대학교 대학원

논문개요

형광 이미징은 세포 또는 조직의 기능이나 병리학적인 정보를 간단하게 시각화 하는 방법이며, 다양한 방법 중 화학적으로 합성된 프로브는 다른 형광 이미징 방법들보다 간편한 도구로서 개발되었다. 그 중 본 연구는 세포 대사에 중요한 역할을 하는 lipid droplets (LD)를 타겟으로 하는 형광 프로브를 합성하고 평가하였다. 선행 연구를 통해 개발된 형광물질인 LFP-1의 donor-acceptor 구조를 기반으로 하여, 형광 moiety와 dioxaborine-barbiturate core의 치환기 변화를 통해 형광 강도와 세포 투과도를 향상시켰으며, 실제로 100배 이상의 형광 강도 증가와 더 나은 세포 투과도를 보여주었다. 또한 실제 세포 내 LD를 선택적으로 타겟 하는지 확인하기 위해 다양한 세포주에서 LD의 모양과 동적 변화를 확인하였고 상업용 프로브와의 성능 비교를 수행하였다. 본 연구를 통해 개발된 형광 프로브는 LD의 세포 내 기능과 변화를 효과적으로 확인하는데 유용한 도구로서 활용될 수 있고, 암, 대사성 질환과 같은 병리학적 진단 도구로 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

목 차

논문개요

List of figures

List of tables

List of schemes

I. 서론	1
II. 결과 및 고찰	6
1. 응집 유도 발광 기반 형광 프로브 합성	6
2. 분광학적 특성 평가.....	9
1) 형광 프로브의 분광학적 특성 평가	9
2) HeLa cell을 이용한 다중 염색 이미징 확인	13
3) 혼합 용매에서 분광학적 특성 평가	14
3. 형광 현미경을 이용한 세포 이미징	17
1) 3T3-L1 cell을 통한 LD 선택성 및 상업용 형광 프로브와의 비교	17
2) HeLa cell을 통한 다중 염색 이미징 확인	21

3) HepG2 cell을 통한 암세포 내 LD 탐지 능력 평가.....	23
4. 세포 독성 평가	25
III. 결론	27
IV. 실험	28
1. 실험기기 및 시약	28
1) 실험기기	28
2) 시약	29
2. 실험방법	30
1) 합성	30
2) 분광학적 특성 평가	41
3) 형광 현미경을 통한 세포 이미징.....	42
4) 세포 독성 평가.....	45

참고문헌

ABSTRACT

List of figures

Figure 1. Lipid droplet structure and its roles in cells.

Figure 2. Strategy of dioxaborine-barbiturate AIE probe.

Figure 3. Normalized absorbance, emission profile.

Figure 4. Excitation and emission profile of LFP-1, EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72.

Figure 5. Cell imaging with LFP-1, EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72 (HeLa cell, RFP channel).

Figure 6. Emission spectrum and mixtures image of EJ-1-69.

Figure 7. Differentiated 3T3-L1 cell (day 15).

Figure 8. Co-localization images of 3T3-L1 cells with EJ-1-69, BODIPY 493/503.

Figure 9. Confocal fluorescence image of 3T3-L1 cells stained with BODIPY 493/503 and EJ-1-69 with no wash.

Figure 10. Confocal fluorescence image of HeLa cells stained with BODIPY 493/503, EJ-1-69, Mitotracker-Green, Lysotracker-Green.

Figure 11. Confocal fluorescence image of HepG2 cell stained with EJ-1-69.

Figure 12. Graph of cell viability.

Figure 13. Structure of lipid binding region.

Figure 14. Structure of EJ-1-64.

Figure 15. Structure of EJ-1-66.

Figure 16. Structure of AIE-gen region.

Figure 17. Structure of EJ-1-48.

Figure 18. Structure of EJ-1-68.

Figure 19. Structure of EJ-1-69.

Figure 20. Structure of EJ-1-72.

List of tables

Table 1. Spectroscopic properties of LFP-1, EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72 in various solvents.

Table 2. Molar absorptivity and quantum yield of EJ-1-69 in various solvents.

Table 3. cell viability.

List of schemes

Scheme 1. Representative AIE probes for LD imaging.

Scheme 2. Design of dioxaborine–barbiturate AIE probe.

Scheme 3. General synthetic scheme of LFP-1, EJ-1-68, 69, 72.

I. 서론

Lipid droplets (LD)는 중성 지방을 저장하고 제어하는 중요한 소기관으로 세포 내에서 에너지 저장소, 세포막 유연성 증진, 신호 분자 전구체 공급 등을 담당하는 역할을 한다.¹ LD의 구조는 중성 지방 핵을 트리아실글리세롤(triacylglycerols) 및 스테롤에스터(Sterol ester)로 구성된 인지질 단일층이 감싸고 있고², 인지질의 아실 체인(acyl chain)은 핵으로 향하고 극성 헤드 그룹은 세포질로 향해 있다.³ 이외에도 표면에는 지질 대사를 조절하는 perilipin family 단백질과⁴ 막 트래픽이나 단백질 대사를 가능하게 하는 다양한 효소들이 존재한다.⁵ 이러한 LD는 ER에서 기원하며 세포 내 다양한 크기와 구성을 보이는데, 이들은 지질 항상성을 유지하며 세포 환경의 대사 상태를 반영한다.³ LD 형성과정은 ER의 인지질 이중막 사이에서 중성 지질이 쌓이면서 발생하며⁶, 이 과정은 지질 합성 효소의 존재 및 가용성, 방울 구조 형성을 지원하는 구조 단백질, ER 개조를 촉진할 수 있는 특정 지질산과 같은 여러 요인에 의해 영향을 받을 수 있다.⁷ 이후 LD는 수명 주기동안 세포 내부를 이동하며 세포가 정상적인 세포 활동을 할 수 있도록 돕는데, 미토콘드리아와의 상호작용을 통하여 최적의 에너지 생산을 돕거나⁸, ROS에 의한 세포의 스트레스 및 손상에 대한 완충 역할을 하기도 한다. 하지만 LD의 형성과 성숙을 유발하는 요인과 특정 조건에서 LD의 지방분해나 Autophagy가 어떻게 처리되는지는 아직 완전히 이해되지 않았기 때문에 세포 내 LD의 실시간 고

해상도 모니터링은 LD와 관련된 경로와 병리학에 대한 통찰을 제공할 수 있을 것이다.⁹

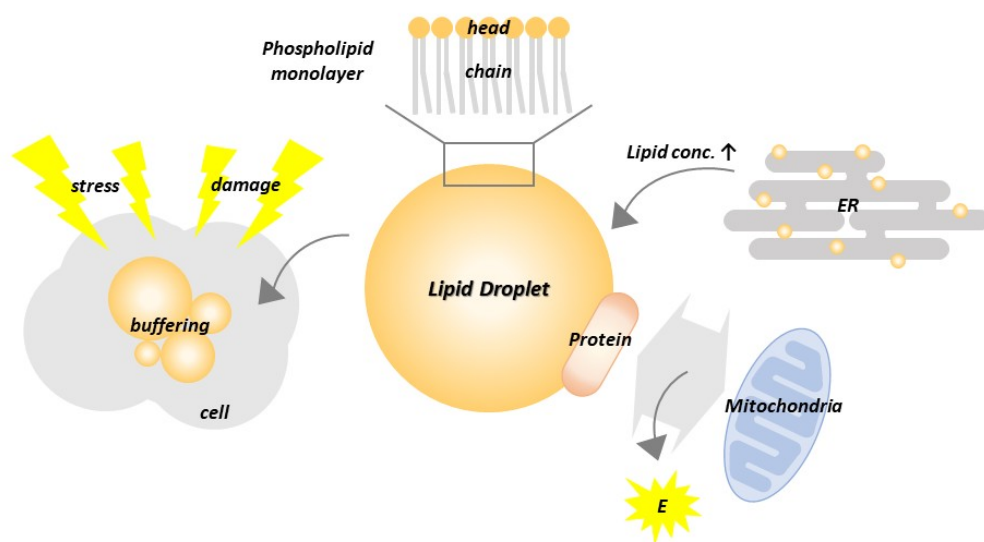
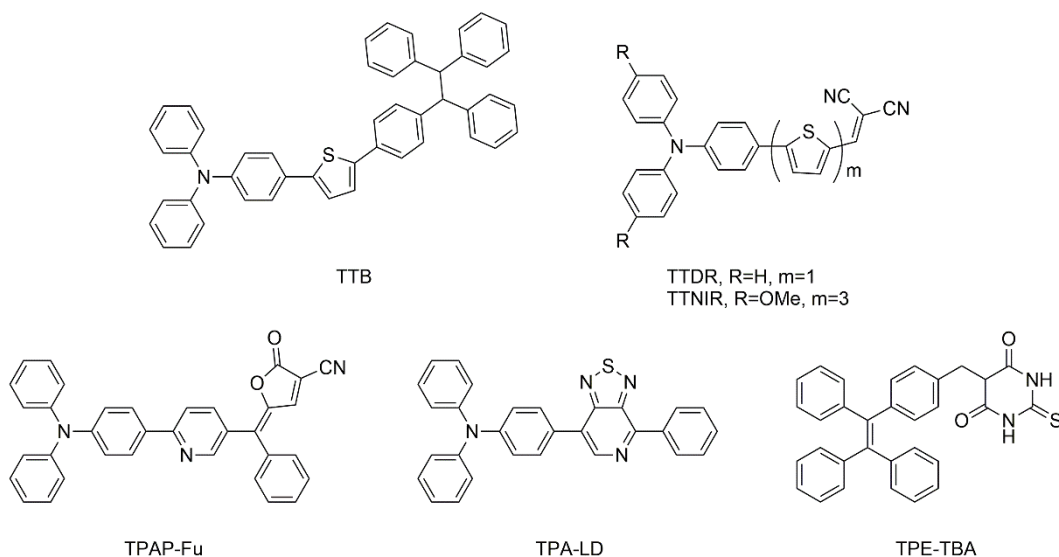


Figure 1. Lipid droplet structure and its roles in cells

형광 이미징은 고해상도 및 단시간에 세포 구성 요소를 시각화하기 위한 간단한 도구 중 하나이고 그 중 화학 프로브는 다른 항체나, 형광 단백질보다 다루기 쉬운 방법이다.^{10,11} LD를 타겟팅하는 형광 프로브는 LD의 역동적인 모양과 실시간 변화를 시각적으로 보여주어 LD의 기능적 역할에 대한 깊은 이해를 가능하게 한다. 가장 대표적인 LD 프로브는 Nile Red와 BODIPY기반 프로브가 있는데, 모두 LD를 성공적으로 염색할 수 있지만 Nile Red의 경우 다른 소기관이나 세포질에 비특이적으로 염색되고 광범위한 흡광 및 형광 파장대를 가지고 있어 다중 염색 이미징에는 적합하지 않고¹², BODIPY의 경우 제한된 광안정성을 가져 낮은 해상도로 인한 적용이 제한된다는 단점이 존재한다.¹³ 이러한 단점을 극복하기 위해 다양한 메커니즘을 가진 LD 특이적 형광 프로브가 개발되었다. 그 중 dioxaborine과 aggregation-induced emission(AIE)을 기반으로 한 형광 프로브가 널리 연구되어져 왔는데, dioxaborine 기반 형광체는 높은 양자 수율과 물 흡광 계수, 뛰어난 광안정성 및 다중 광자 흡수와 같은 광물리적 성질을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.^{14,15} 대부분의 경우 electron donor(D)와 electron acceptor(A)가 공액에 의해 연결된 D- π -A, 반복된 D- π -A- π -D와 같은 구조를 가지고¹⁶, 이러한 구조는 push-pull mechanism에 의한 intramolecular charge transfer(ICT)을 가능하게 한다. 극성이 강한 용매에서는 e- donor와 e- acceptor 간의 비틀림이 발생하여 Twisted intramolecular charge transfer(TICT)를

유발하여 환경의 극성 변화에 따른 형광 방출 변화를 나타낸다.¹⁷ 극성 변화에 민감하다는 것은 다른 세포 소기관에 비해 비극성인 지질에 특이적인 선택성을 부여할 수 있을 것으로 생각한다. AIE 기반 형광 프로브는 제한된 공간에서 분자의 회전이 제한되어 집합체를 형성할 경우 형광 신호가 증가하고, 좋은 광안정성과 우수한 생체 적합성으로 인해 다양한 형광 이미징 분야에서 활용되고 있다.¹⁸ 또한, 널리 사용되는 AIE 형광 moiety인 triphenylamine (TPA), tetraphenylethylene (TPE) group은 push-pull mechanism을 위한 뛰어난 e- donor로 작용하여 형광 신호를 극대화할 수 있다. 이러한 형광 프로브의 경우 일반적으로 높은 선택성과 낮은 배경 형광을 보이며, 살아있는 세포와 조직의 연상화에 유용한 적색 이동 방출을 나타낸다.



Scheme 1. Representative AIE probes for LD imaging¹⁹⁻²³

본 연구에서는 LD를 타겟으로 하는 신호 증폭이 가능한 새로운 형광 물질을 개발하고자 AIEgen과 dioxaborine를 결합하여 push-pull interaction mechanism을 활용한 donor-acceptor 구조의 형광 프로브를 합성하였다. 선행 연구를 통해 지문에 존재하는 지질을 선택적으로 탐지할 수 있는 형광 프로브 “LFP-1”을 개발하였으며²⁴, 이번 연구에서는 이를 확장하여 세포 내 LD를 타겟할 수 있도록 기존의 프로브가 갖는 cyclohexyl 치환체 외에 methyl 치환체를 추가하고 AIE를 유도할 수 있는 TPE group 외에도 TPA group을 추가한 유도체들을 합성함으로써 더 강한 형광 증폭과 장파장으로의 형광 파장 이동을 확인하였다. 합성한 프로브를 물리화학적 분석을 통해 LD 프로브로서 능력을 평가했고, 다양한 종류의 세포주에 적용하여, LD 선택적 표지 유무를 형광 현미경과 공초점 현미경으로 관찰하였다.

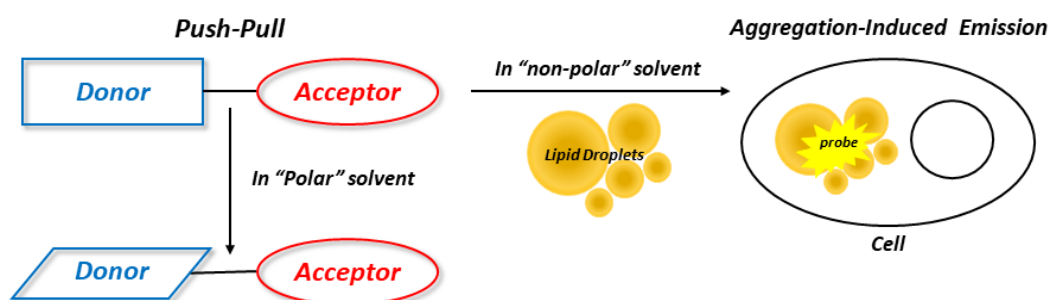
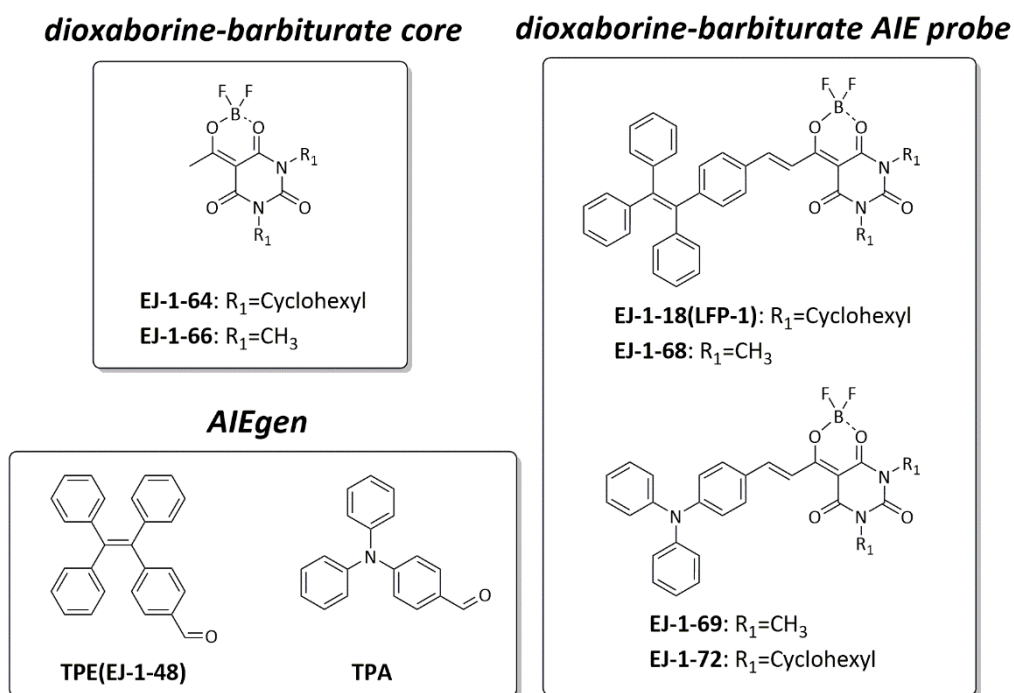


Figure 2. Strategy of dioxaborine-barbiturate AIE probe.

II. 결과 및 고찰

1. 응집 유도 발광 기반 형광 프로브 합성

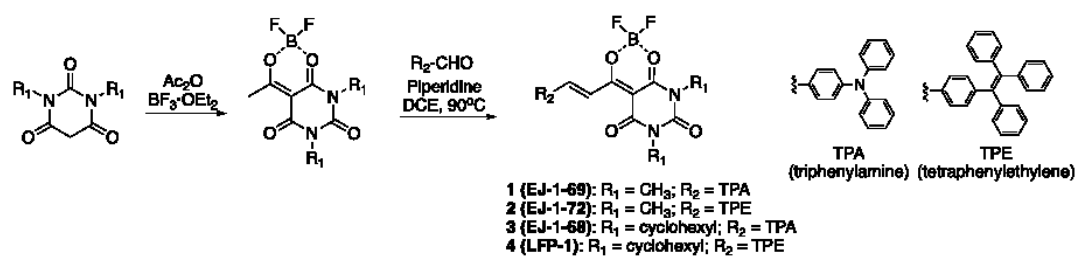
본 연구에서는 기존에 사용되던 LD 프로브의 단점을 개선하기 위해 극성 용매 내에서의 TICT을 유도하여 큰 Stokes shift과 지질 선택성을 부여하고, AIE의 특성을 이용하여 비극성 용매인 지질 내 응집 후 강한 형광을 발휘하도록 디자인하였다. 선행 연구로 디자인된 “LFP-1”²⁴은 극성 용매에서 뛰어난 TICT 효과를 관찰하였고, AIE 현상에 의해 회전이 제한될 경우 최대 24배의 형광증가현상을 확인할 수 있었으며 이를 활용함으로써 지문내 지질과 선택적으로 반응하여 level 3 단계 (땀샘 및 개인별 미세특성 식별) 까지 지문감식이 가능함을 보인 바 있다. 따라서 본 연구에서는 LFP-1 구조를 기반으로 하여 dioxaborine-barbiturate core의 치환기를 methyl로 변경해 지질 선택성 및 세포 투과도를 높이고, AIE 구조를 TPE에서 TPA로 변경하여 형광 신호를 증폭하고, 장파장으로 형광 파장 이동을 유도하였다.



Scheme 2. Design of dioxaborine-barbiturate AIE probe.

Dioxaborine-barbiturate core는 barbituric acid에 BF₂를 결합시켜 합성하였고, TPE aldehyde (EJ-1-48)는 스즈키-미야우라 반응을 이용하여 합성 후 정제하여 사용하였다. LFP-1의 dioxaborine-barbiturate core와 AIE의 합성 과정에서 C=C bond에 -OH가 빠져나가지 않아 C-C로 결합되는 경우가 있어, 이번 실험에서도 최대한 수분을 제거하기 위해 모든 초자기구 및 기기를 24시간 동안 90℃ 오븐에서 건조하였고, 반응 시약은 용매를 제외하고 모두 Schlenk line에서 하루 이상 건조하여 외부에 노출되는 시간을 최소한으로 줄여 대기 중 수분이 반응을 방해하

는 것을 억제하였다. 합성 이후 silica gel을 이용한 column chromatography를 통해 정제하였다. 단, EJ-1-69의 경우 column 내부 silica gel에 흡착되어 낮은 수득률을 가진다. 최종 생성물에 대한 확인은 ^1H NMR, ^{13}C NMR과 LC-MS를 통해 확인하였으며, dioxaborine-barbiturate core는 BF_2 가 안정적으로 결합했는지 확인하기 위해 ^{19}F NMR을 추가로 측정하였다.



Scheme 3. General synthetic scheme of LFP-1, EJ-1-68, 69, 72.

2. 분광학적 특성 평가

1) 형광 프로브의 분광학적 특성 평가

형광 프로브의 분광학적 특성은 용매에 따른 파장 이동현상 solvatochromism을 평가하기 위해 다양한 용매에서 측정되었다. TPE coupling된 프로브(LFP-1 and EJ-1-68)는 406~444nm에서 absorbance max, 580~676nm에서 emission max를 가지고, TPA coupling된 프로브(EJ-1-69 and EJ-1-72)는 502~532nm에서 absorbance max, 606~658nm에서 emission max를 가진다. TPA coupling된 프로브는 TPA 내부의 N원자의 여분의 전자가 존재하여 TPE coupling 프로브보다 red-shift된 형광을 볼 수 있고, TPE coupling 프로브는 극성 변화에 더 민감하며, 큰 stokes shift (138~242nm)를 보여주었다. 특히 TPA coupling 프로브는 DMSO, EtOH과 같은 극성 용매에서 형광이 매우 낮거나 없는 것으로 보이고, toluene과 같은 비극성 용매에서 높은 형광 신호가 관찰되었다. 하지만 dioxaborine-barbiturate core의 methyl/cyclohexyl 치환 차이에 의한 결과는 absorbance, emission spectrum이 비슷한 것으로 보아 없는 것으로 보인다.

Solvent	LFP-1			EJ-1-68			EJ-1-69			EJ-1-72		
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Stokes shift (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Stokes shift (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Stokes shift (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Stokes shift (nm)
Toluene	444	587	143	442	580	138	520	606	86	520	606	86
1,4-Dioxane	438	604	166	434	604	170	516	624	108	514	620	106
THF	436	626	190	430	628	198	512	620	126	512	612	100
DCM	443	648	205	444	654	210	532	658	126	527	632	105
Isopropanol	438	627	189	434	632	198	502	642	140	520	624	104
EtOH	435	643	208	430	640	210	520	646	126	516	630	114
MeOH	423	631	208	406	622	216	526	642	116	506	618	112
Acetone	427	655	228	422	640	218	512	622	110	510	614	104
DMSO	433	666	233	434	676	242	524	654	130	523	626	103

Table 1. Spectroscopic properties of LFP-1, EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72 in various solvents.

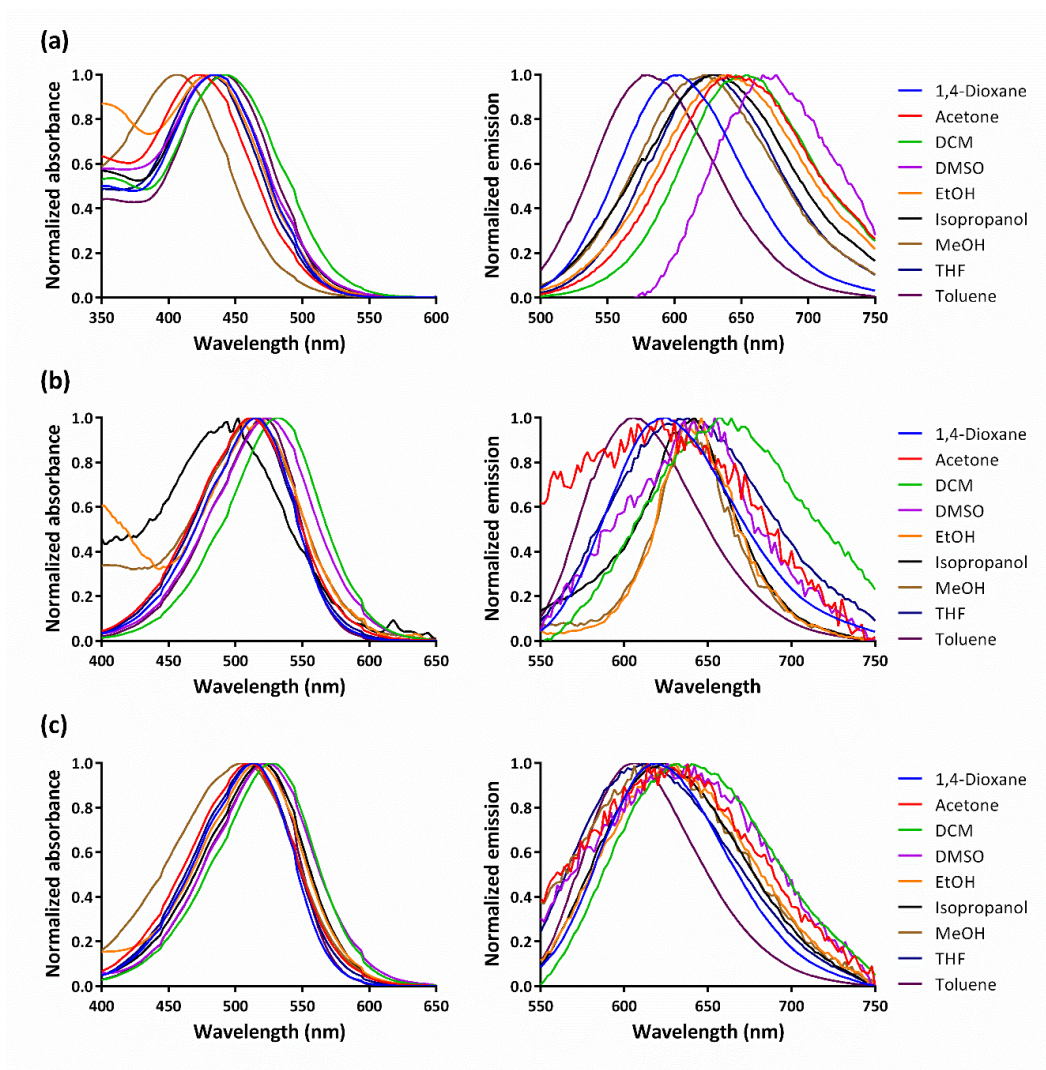


Figure 3. Normalized absorbance, emission profile. (a) EJ-1-68. (b) EJ-1-69. (c) EJ-1-72.

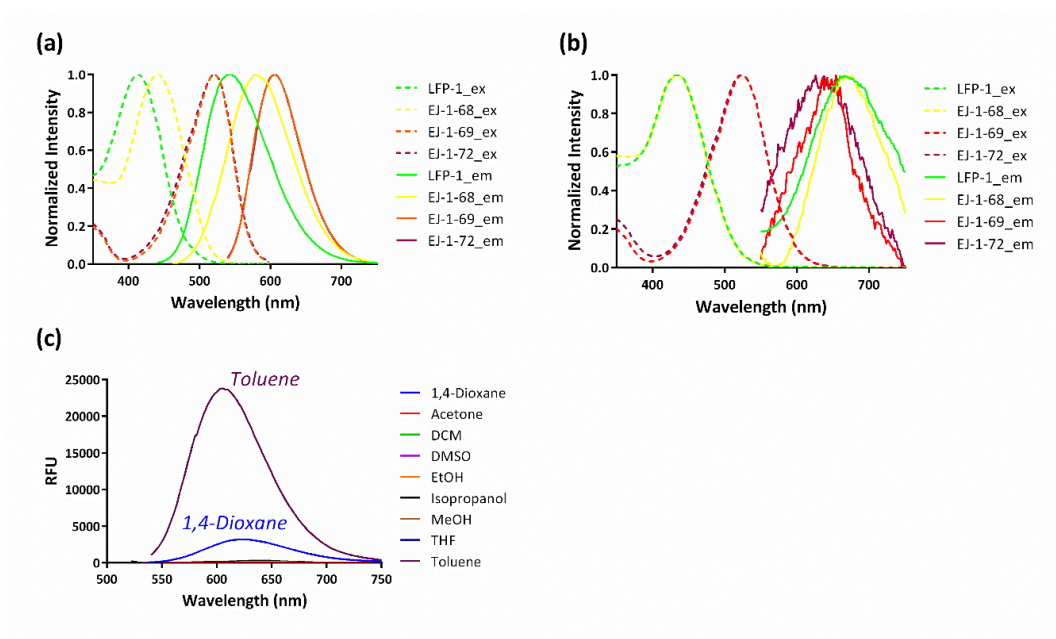


Figure 4. Excitation and emission profile of LFP-1, EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72. (a) in toluene (b) in DMSO. (c) Emission spectrum scan of EJ-1-69.

2) HeLa cell을 이용한 세포 투과도 확인

HeLa cell을 사용하여 실제로 형광 프로브가 세포 내로 들어가 선택적으로 LD를 염색할 수 있는지 알아보기 위해 형광 현미경을 통해 세포 이미지를 수행하였다. 세포에 LFP-1, EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72를 각각 $5\mu\text{M}$ 로 2시간 동안 처리하여 PBS로 wash를 하지 않았을 경우, wash를 한 경우 모두 비교하였다. Figure 5의 EJ-1-69를 보면 wash를 한 경우와 하지 않은 경우 모두 EJ-1-69가 세포 내로 들어가 세포 모양을 따라 염색된 반면, 다른 프로브의 경우 세포 내로 들어가지 않고 세포 밖에 분산되어 있거나 뭉쳐 있는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 4개의 형광 프로브 중 세포 내부로 들어가는 EJ-1-69를 이용하여 후속 실험을 진행하였다.

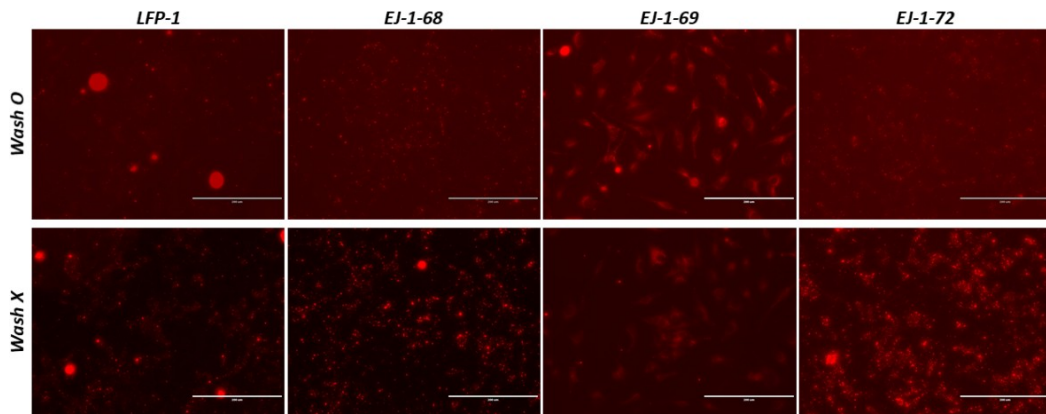


Figure 5. Cell imaging with LFP-1, EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72 (HeLa cell, RFP channel).

3) 혼합 용매에서 분광학적 특성 평가

EJ-1-69의 다양한 용매에서의 몰 흡광도와 양자 수율을 측정한 결과 알코올과 같은 protic solvent에서 polar aprotic solvent에 비해 상대적으로 낮은 몰 흡광도를 나타냈다. Toluene, dioxane과 같은 non-polar solvent에서는 0.41 및 0.076의 상대적으로 높은 형광 양자 수율을 보였으나 다른 polar solvent에서는 형광이 측정되지 않았다.

Solvent	Molar absorptivity (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	Quantum yield	Solvent dielectric constant ^a
Toluene	36126	0.41	2.38
1,4-Dioxane	21307	0.076	2.21
THF	21599	NE	7.52
DCM	44076	NE	9.08
Isopropanol	15539	NE	18.3
EtOH	17306	NE	24.6
MeOH	15355	NE	32.6
Acetone	26561	NE	21.0
DMSO	20825	NE	46.7

^a The solvent dielectric constants were taken from <https://organicchemistrydata.org/solvents/>.

Table 2. Molar absorptivity and quantum yield of EJ-1-69 in various solvents. (NE = non-emissive)

이러한 EJ-1-69의 특성인 극성에 따른 형광 메커니즘을 알아보기 위해 극성이 다른 여러 용매의 혼합에서 분광학적 특성을 확인해 보았다. Toluene-THF mixture에서 absorbance λ_{\max} 는 toluene 0%에서 40%이 되면서 증가했지만 toluene 100%으로 증가할 경우 감소했다. Figure 6의 (c) mixture 사진을 보면 THF 100%에서는 형광이 존재하지 않지만 toluene 비율이 증가함에 따라 형광이 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 형광 강도가 약 100배 이상 증가한 것으로 측정된다. 이는 EJ-1-69 구조의 push-pull mechanism에 의한 극성에 따른 형광 신호 증가로 생각할 수 있고, 특히 비극성 환경에서 형광 신호가 크게 증가하고 이는 비극성인 LD의 이미징에 탁월한 것으로 생각된다. TPA moiety가 AIEE (Aggregation-induced Emission Enhancement)로도 알려져 있기 때문에 dioxane과 물 mixture의 형광도 측정하였다. Figure 6의 (d) dioxane-물 mixture는 toluene-THF mixture에 비해 극성이 높아 상대적으로 낮은 형광 신호가 나타나는데 이는 물 비율이 높은 용액에서 EJ-1-69가 고체 침전물을 생성하기 때문으로 보인다. 고체 상태의 EJ-1-69에 450nm의 LED를 조사해보면 AIE 특성을 관찰할 수 있는데, 이를 통해 세포 내 LD에 EJ-1-69가 축적되어 고농도로 존재하더라도, 일반적인 형광물질에서 흔히 발견되는 형광 소실 (aggregation-caused quenching, ACQ) 대신 EJ-1-69가 갖는 AIE에 의해 형광신호가 증폭될 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

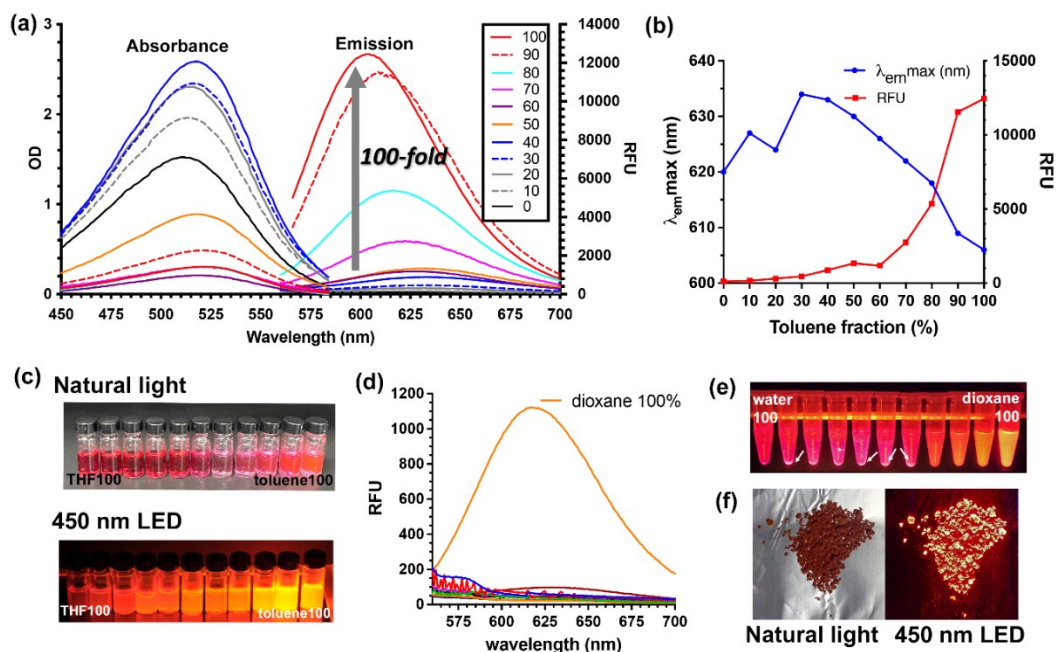


Figure 6. Emission spectrum and mixtures image of EJ-1-69. (a) Toluene-THF mixtures. The graphs are shown based on the % composition of toluene. (b) emission maximum wavelength (blue line) and maximum fluorescence value (red line). (c) Toluene-THF mixtures image on natural light and 450nm LED. (d) 1,4-Dioxane-water mixtures. The graphs are shown based on the % composition of dioxane. (e) 1,4-dioxane-water mixtures image on 450nm LED. (f) Photographs of EJ-1-69 in solid state.

3. 형광 현미경을 통한 세포 이미징

1) 3T3-L1 cell을 통한 LD 선택성 및 상업용 형광 프로브와의 비교

3T3-L1 cell의 differentiation

3T3-L1 cell 은 mouse 배아에서 분리한 fibroblast로 differentiation을 할 경우 세포 내부에 LD가 축적되는 것을 확인할 수 있다. 3T3-L1 cell 의 differentiation은 15~20일정도 소요되고, 70~80% differentiation된 세포는 Figure 7과 같이 세포 내 크고 작은 지방들이 관찰된다. 과도하게 분화될 경우 LD가 서로서로 모여 거대한 하나의 LD가 되는 경우도 있기 때문에 실험에는 70%정도 differentiation이 완료된 세포를 사용하였다.

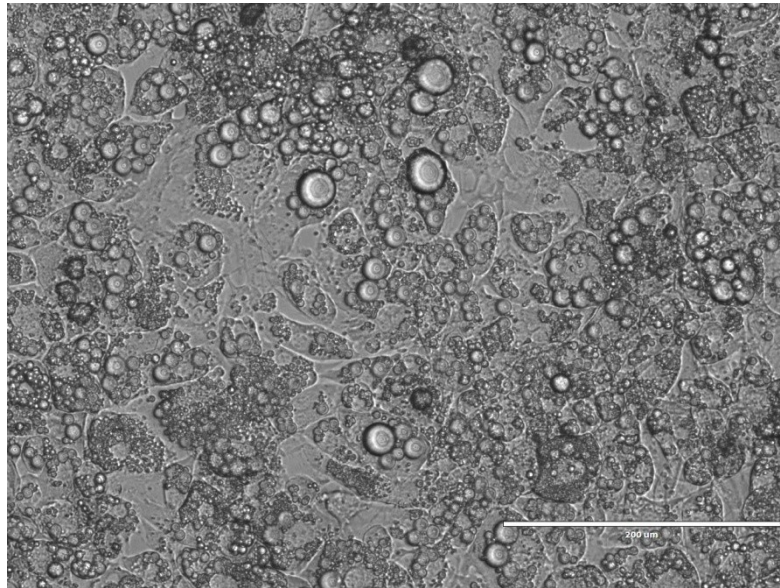


Figure 7. Differentiated 3T3-L1 cell (day 15).

3T3-L1 cell을 통한 LDs 선택성 확인

실제로 EJ-1-69가 세포 내에 존재하는 LD를 선택적으로 이미징할 수 있는지 알아보기 위하여 LD에 선택적인 상업용 형광 프로브인 BODIPY 493/503을 이용하여 형광 신호가 겹쳐지는 지를 확인하였다. 3T3-L1 cell 내 LD 형성을 유도하기 위해 differentiation 후 BODIPY 493/503은 200 nM, EJ-1-68 500 nM의 농도로 1시간 동안 처리한 후 남아있는 프로브를 wash하여 제거하였다. Figure 8을 보면 BODIPY와 EJ-1-69 모두 중심부와 외각에 존재하는 LD를 선명하게 보여주었고, (e) 3D 이미지를 통해 LD의 입체구조를 관찰할 수 있었다. 두 프로브 간의 Pearson correlation coefficient는 0.96으로 강한 일치도를 가지는 것으로 보인다.

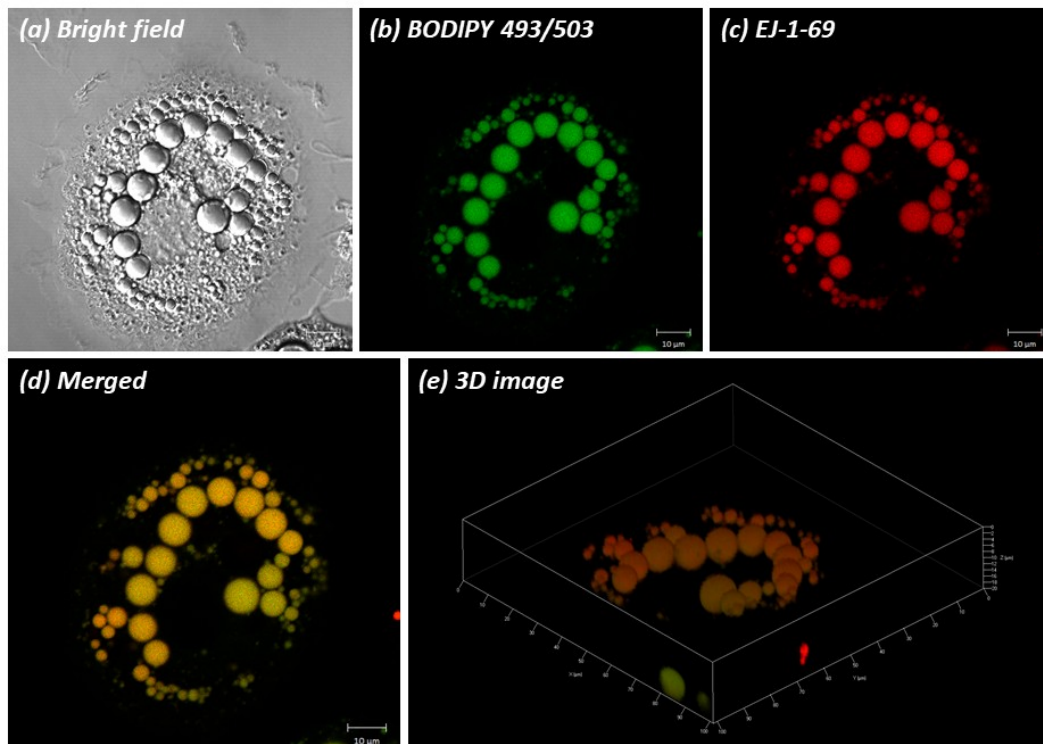


Figure 8. Co-localization images of 3T3-L1 cells with EJ-1-69, BODIPY 493/503. BODIPY 493/503: $\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=300-514\text{nm}$, EJ-1-69: $\lambda_{\text{ex}}=555\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=568-800\text{nm}$. Scale bar: $10\ \mu\text{m}$.

Figure 8과 동일한 조건에서 잔여 프로브를 제거하지 않았을 경우, Figure 9에서 볼 수 있듯이 BODIPY 493/503은 LD를 제외한 세포질에 잔여 형광이 남아있는 반면, EJ-1-69는 LD에서만 선택적으로 형광 신호를 나타낸것을 볼 수 있었다. 이를 통해 EJ-1-69가 상업용 형광 프로브의 단점인 불필요한 세포질 염색을 보완하였음을 확인할 수 있다.

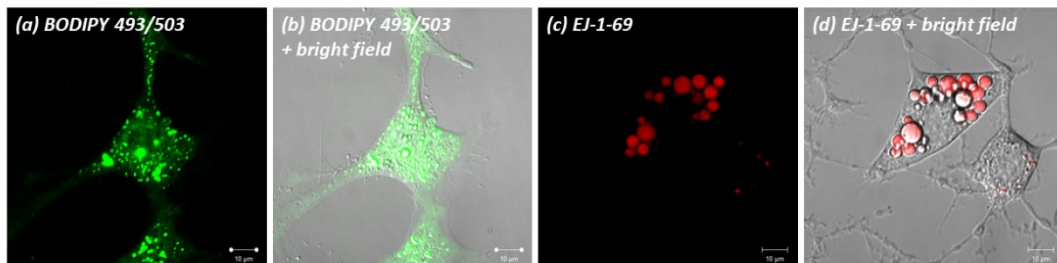


Figure 9. Confocal fluorescence image of 3T3-L1 cells stained with BODIPY 493/503 and EJ-1-69 with no wash. BODIPY 493/503: $\lambda_{ex}=488\text{nm}$, $\lambda_{em}=300-514\text{nm}$, EJ-1-69: $\lambda_{ex}=555\text{nm}$, $\lambda_{em}=568-800\text{nm}$. Scale bar: $10\ \mu\text{m}$.

2) HeLa cell을 통한 다중 염색 이미징 확인

다음은 EJ-1-69가 세포 내 LDs가 아닌 다른 세포 소기관에 어떻게 존재하는지 알아보기 위해 이미징을 진행하였다. 보다 뚜렷하게 LD를 관찰하기 위하여, HeLa cell에 중성 지질인 올레산을 처리하여 LD 생성을 유도하고 이미징 실험을 수행하였다. EJ-1-69은 주로 BODIPY 493/503과 겹쳤으며, 이전 3T3-L1 cell에서 관찰했던 것과 유사한 양상을 보인다. Mitotracker-Green, LysoTracker-Green과는 EJ-1-69에서 나오는 LD의 형광 신호와 겹치지 않는 것을 확인할 수 있다.

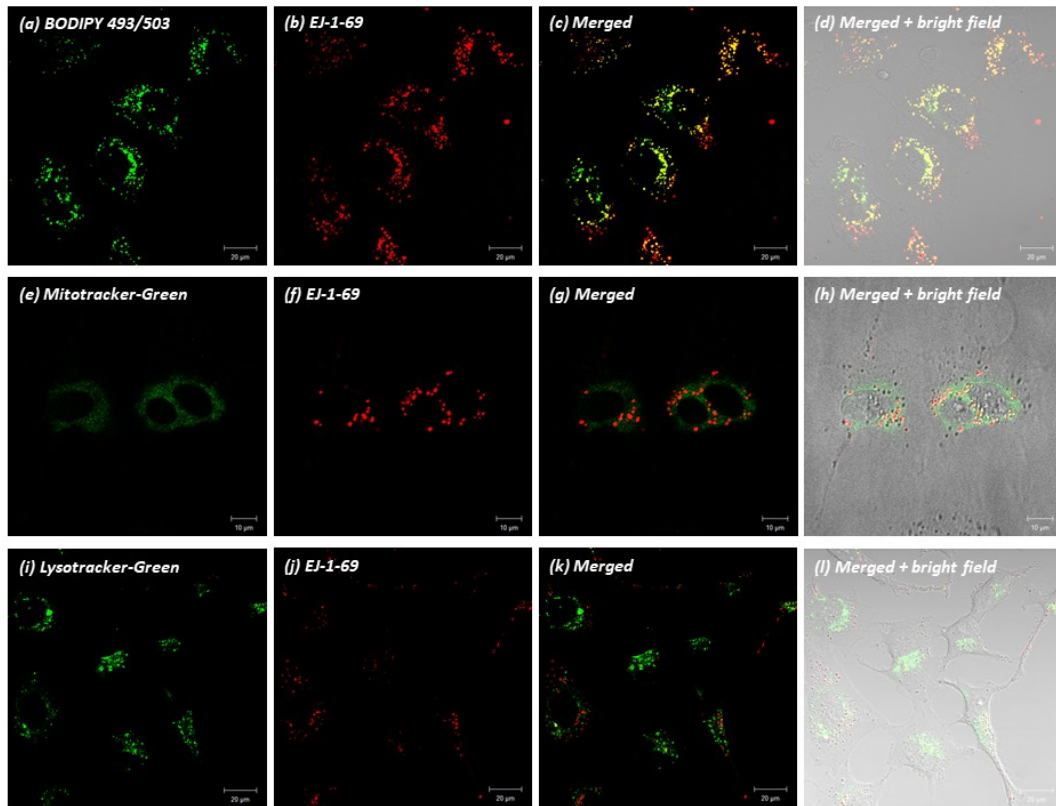


Figure 10. Confocal fluorescence image of HeLa cells stained with BODIPY 493/503, EJ-1-69, Mitotracker-Green, Lysotracker-Green.

EJ-1-69: $\lambda_{\text{ex}}=555\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=568-800\text{nm}$, BODIPY 493/503: $\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=300-514\text{nm}$, Mitotracker-Green: $\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=300-520\text{nm}$, Lysotracker-Green: $\lambda_{\text{ex}}=488\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=300-522\text{nm}$.

Scale bar: $20\ \mu\text{m}$.

3) HepG2 cell을 통한 암세포 내 LD 탐지 능력 평가

간세포는 지방축적을 연구할 수 있는 좋은 세포 모델로 알려져 있다.²⁵ 또한 LD가 다양한 종류의 암세포에서 축적되며 이들의 축적 및 가용이 암세포의 증식 및 사망의 과정에 기여한다는 것이 연구되었다.²⁶ EJ-1-69의 암세포 내의 LD 연구에 활용될 수 있는지 알아보기 위해 사람의 간암 세포인 HepG2 cell을 이용하여 세포 이미징을 진행하였다. 지방 세포에 비해 많은 지질이 있는 것은 아니지만 Figure 11를 보면 세포 내에 존재하는 많은 LD를 선명하게 보여주었고, 3D 이미지에서 세포 내에 존재하는 LD의 입체적인 구조도 확인할 수 있었다.

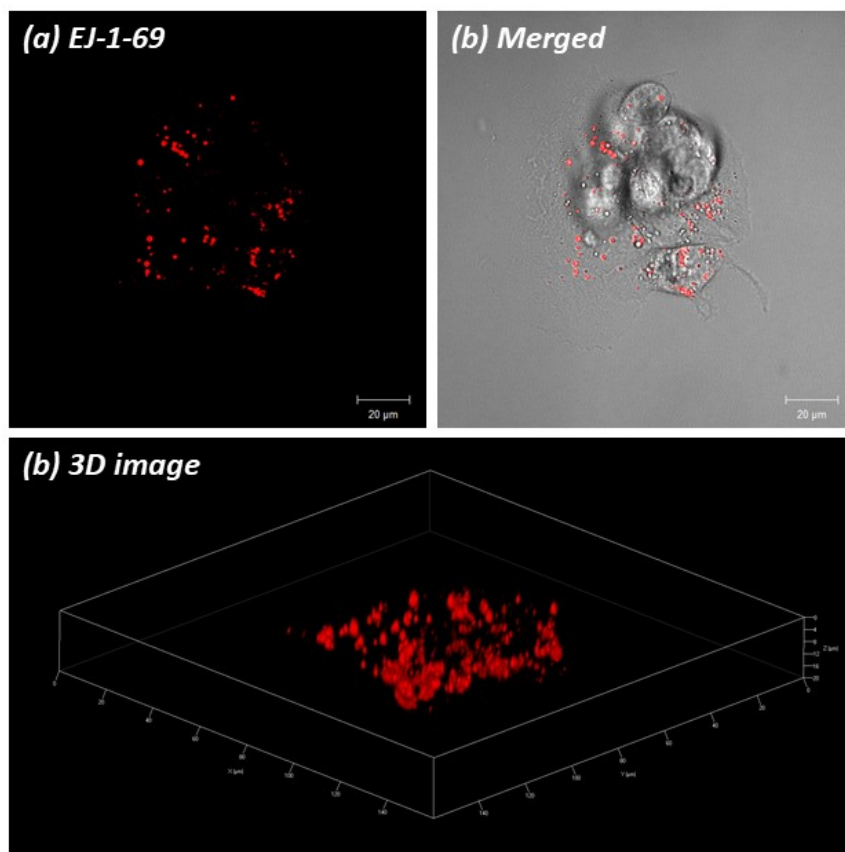


Figure 11. Confocal fluorescence image of HepG2 cell stained with EJ-1-69. EJ-1-69: $\lambda_{ex}=555\text{nm}$, $\lambda_{em}=568-800\text{nm}$. Scale bar: $20\ \mu\text{m}$.

4. 세포 독성 평가

프로브에 대한 독성 평가는 HeLa cell을 사용하여 MTS assay와 trypan blue staining assay로 진행하였다. MTS assay의 경우 EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72를 각각 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M, 5.0 μ M, 10.0 μ M의 농도로 24시간 처리한 후 MTS solution을 넣어 2시간 동안 incubation 하고 별도의 세척과정 없이 490nm에서 absorbance를 측정하였다. Figure 12의 (a)를 보면 농도가 높아짐에 따라 cell viability가 일정한 경향을 보이지 않는데, 이는 assay과정에서 별도로 잔여 프로브를 제거하는 과정을 거치지 않았고, 세포 내부에 프로브가 남아 absorbance가 같이 찍힐 수 있기 때문에 다음과 같은 결과가 나온 것으로 보인다.

EJ-1-69의 경우 물질 자체의 흡광 때문에 MTS assay 결과에 영향을 주는 것으로 판단하고, 보다 정확한 cell viability 측정을 위해 EJ-1-69에 한하여 trypan blue staining assay를 통해 세포 독성을 파악하였다. EJ-1-69를 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M의 농도로 6시간 동안 처리하고, 살아있는 세포를 trypan blue로 염색한 후 DMSO만 처리한 세포 대비 살아있는 세포의 수를 직접 counting 하였다. Figure 12의 (b)를 보면 농도가 높아질수록 cell viability는 줄어드는 경향을 보이고, Table 3의 (b)를 보면 1 μ M에서 97.0%, 50 μ M에서 81.4%로 50 μ M의 고농도로 세포에 처리하더라도 비교적 높은 cell viability를 보여주는 것으로 확인할 수 있다.

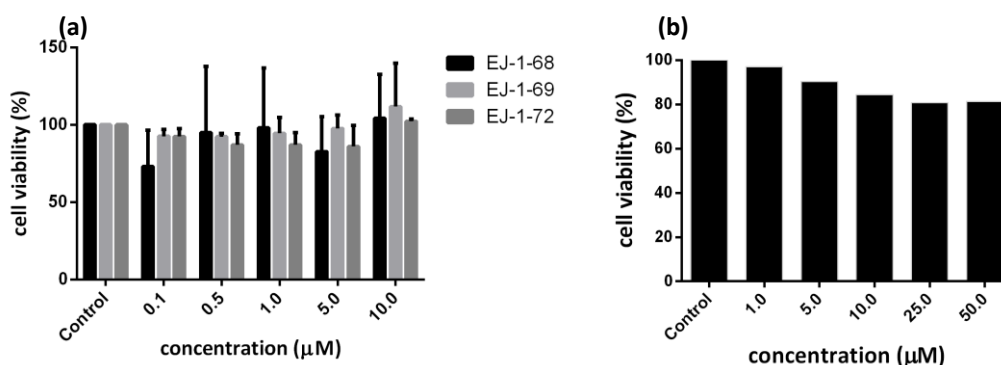


Figure 12. Graph of cell viability. (a) MTS assay of EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72 (b) trypan blue staining assay of EJ-1-69.

Cell viability (%)	Control	0.1 μM	0.5 μM	1.0 μM	5.0 μM	10.0 μM
EJ-1-68	100.0	89.6	125.2	125.4	98.8	124.3
	100.0	56.5	64.7	70.8	66.5	84.3
EJ-1-69	100.0	95.9	93.8	101.8	103.8	131.7
	100.0	89.4	90.9	87.2	91.6	92.0
EJ-1-72	100.0	88.7	82.0	81.6	76.5	103.3
	100.0	96.1	92.1	92.6	95.7	101.2

Cell viability (%)	Control	1 μM	5 μM	10 μM	25 μM	50 μM
EJ-1-69	100.0	97.0	90.4	84.4	80.8	81.4

Table 3. cell viability. (a) MTS assay of EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72. (b) trypan blue staining assay of EJ-1-69.

III. 결론

본 논문에서는 선행 연구를 통해 개발한 LFP-1의 한계점인 낮은 형광 증폭과 녹색 파장대의 형광을 개선하기 위해, 치환기를 변형하여 세포 내 LD를 타겟하는 형광 프로브를 합성하고, 세포 이미징을 통해 그 성능을 실험하였다. 여러 가지 합성 프로브 중 LFP-1의 TPE를 TPA로, cyclohexyl을 methyl로 변경한 EJ-1-69가 특히 세포 투과도가 가장 좋았고, LD와 같은 비극성 용매 toluene에서 100배가 넘는 형광 신호의 증폭을 확인할 수 있었다. 이는 EJ-1-69 구조적 특성으로 인한 push-pull mechanism에 의해 극성에 따른 신호 증가로 생각할 수 있고, 특히 비극성 환경에서 형광 신호가 크게 증가하고 이는 비극성인 LD의 이미징에 탁월한 것으로 생각된다. 세포 이미징에서 기존의 LD에 선택적인 BODIPY 493/503과 비교했을 때, 세포 내 LD를 평면뿐만 아니라 3D 이미징에서도 높은 일치도를 보였고, 다양한 세포 내 영역에 존재하는 LD를 이미징할 수 있는 능력을 확인하였다. 따라서 EJ-1-69가 새로운 LD 선택적 프로브로 사용될 수 있는 것을 확인하였고, 추후에는 치환기의 변형을 통한 형광신호 조절 및 orthogonal bioconjugation의 응용 등, 다양한 물질이나 소기관을 검출하는 데 활용될 수 있는 새로운 신호증폭성 형광물질을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

IV. 실험

1. 실험기기 및 시약

1) 실험기기

화합물 정제를 위한 flash column chromatography는 Merck사의 Silica gel 60 (Merck-Millipore)를 사용하였다. ^1H NMR과 ^{13}C NMR, ^{19}F NMR 스펙트럼은 JEOL사의 JNM-ECZ00R/SI 분광계로부터 얻어졌으며 NMR 용매로는 CDCl_3 를 사용하였으며, 액체크로마토그래피-질량분석기 (Liquid Chromatography)는 HP 1100모델로 질량분석기 (MS)는 Electrospray ionization (ESI)방식의 Agilent Technologies 6130 모델을 사용하였고, column은 Agilent XDB-C18모델을 사용하였다. Absorbance, Emission 측정은 Spectramax M5 Multi-Mode Microplate Reader와 (crystal cuvette, 96 well plate)를 사용하였다. 세포 이미징은 EVOS FL imaging system과 Carl Zeiss사의 LSM700 confocal microscope를 사용하였다.

2) 시약

반응에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich, Thermofisher Scientific, Alfa Aesar, Fisher Chemical, TCI, Acros 등을 구입하여 정제 없이 사용하였다. Water는 3차증류수를 사용하였다.

세포 배양에는 HeLa cell, HepG2 cell, 3T3-L1 cell 모두 한국 세포주 은행에서 구매하였으며, 배양 배지는 Gibco™사의 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), DMEM:F12를 사용하여 세포에 따라 Fetal bovine Serum(FBS) 또는 Bovine Calf Serum(BCS), penicillin/streptomycin을 혼합하여 사용하였고, 세포 이미징에는 Opti-MEM을 사용하였다. 3T3-L1 세포 분화에는 Sigma-Aldrich®사의 3T3-L1 differentiation kit (cat. DIF001)를 사용하였고, HeLa cell의 지질 처리는 Sigma-Aldrich®사의 Oleic acid (cat. O1008)를 구매하여 Gibco™사의 Opti-MEM에 희석하여 사용하였다. 세포 독성 평가는 Promega사의 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Gibco™사의 Trypan Blue Solution 0.4%와 INCYTO® 사의 Disposable Hemocytometer를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 합성

Lipid binding region

EJ-1-64와 EJ-1-66은 기존에 알려진 합성법을 참고하여 합성하였다.²⁷

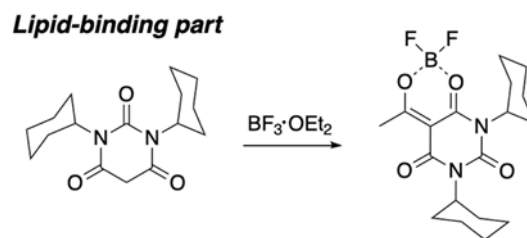


Figure 13. Structure of lipid binding region.

EJ-1-64

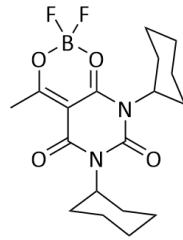


Figure 14. Structure of EJ-1-64.

2,2-difluoro-4,6,8-trimethyl-2,8-dihydro-5*H*-1 λ^3 ,2 λ^4 -
[1,3,2]dioxaborinino[6,5-*d*]pyrimidine-5,7(6*H*)-dione

1,3-dicyclohexylbarbituric acid (665.7mg, 2.25mmol, 1eq)와 acetic anhydride (7.0mL)를 pressure vessel에 넣어 교반하고, 95℃로 가열한다(투명). 95℃가 되면 boron trifluoride diethyl etherate (337.2 μ g, 2.73mmol, 1.2eq)를 넣어준다(노랑색, 투명). 30분 뒤 TLC 확인 (DCM 100%) 후 둥근 바닥 플라스크로 옮겨 고체가 생성될 때까지 감압 증류한다(노란색). 고체 생성물을 여과지에 긁어모은 후, 충분한 MeOH로 노란색이 사라질 때까지 씻어준다(흰색). 이후 고체 생성물을 충분히 건조한다. (흰색 고체) Yield : 671.4mg (78.2%) ESI-MS: m/z calcd. for C₁₈H₂₅BF₂N₂O₄ [M+H]⁺: 383.19; found: 383.1.

EJ-1-66

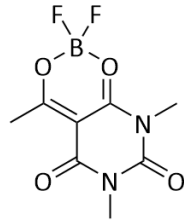


Figure 15. Structure of EJ-1-66.

6,8-dicyclohexyl-2,2-difluoro-4-methyl-2,8-dihydro-5*H*-
1 λ^3 , 2 λ^4 -[1,3,2]dioxaborinino[6,5-*d*]pyrimidine-5,7(6*H*)-dione

1,3-dicyclohexylbarbituric acid (449.4mg, 3.20mmol, 1eq)와 acetic anhydride (5.0mL)를 pressure vessel에 넣어 교반하고, 95℃로 가열한다(투명). 95℃가 되면 boron trifluoride diethyl etherate (552.0 μ g, 3.89mmol, 1.2eq)를 넣어준다(노랑색, 투명). 40분 뒤 TLC 확인 (DCM 100%) 후 등근 바닥 플라스크로 옮겨 고체가 생성될 때까지 감압 증류한다(노란색). 고체 생성물을 여과지에 긁어모은 후, 충분한 MeOH로 노란색이 사라질 때까지 씻어준다(흰색). 이후 고체 생성물을 충분히 건조한다. (흰색 고체) Yield : 302.2mg (38.4%) ESI-MS: m/z calcd. for C₈H₉BF₂N₂O₄ [M+H]⁺: 247.06; found: 247.0.

AIE-gen region

EJ-1-48은 기존에 알려진 합성법을 참고하여 합성하였다.²⁸

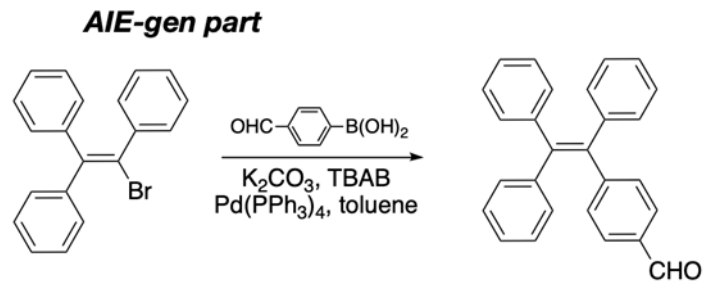


Figure 16. Structure of AIE-gen region.

EJ-1-48

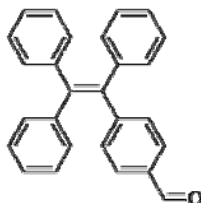


Figure 17. Structure of EJ-1-48.

4-(1,2,2-triphenylvinyl)benzaldehyde

2-bromo-1,1,2-triphenylethylene (936.0mg, 2.79mmol, 1eq)와 toluene (17.0mL)을 two neck round bottom flask에 넣고 교반한다. 순서대로 4-formylphenylboronic acid (626.6mg, 4.18mmol, 1.5eq), Tetrabutylammonium bromide (92.6mg, 0.29mmol, 0.1eq), 2M K_2CO_3 aqueous solution (4.5mL)를 넣고 30분동안 상온에서 교반한다. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium (5mg)을 넣고 90℃로 가열하며 24h시간동안 reflux한다. 24시간 후 반응 용액을 DW에 붓고, 동량의 EA로 3번 추출한 후 $MgSO_4$ 로 수분을 제거한다. $MgSO_4$ 를 종이 필터 여과하고, EA를 감압 증류한다. 전개용매 Hexane:DCM=2:1 조건으로 silica gel column chromatography를 하여 정제한다. (형광 연두색 고체)
Yield : 465.1mg (46.2%) ESI-MS: m/z calcd. for $C_{27}H_{20}O$ [M+H]⁺: 361.15; found: 361.3.

dioxaborine–barbiturate AIE probe

EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72의 합성은 선행 연구를 통해 합성한 LFP-1 (EJ-1-18)의 합성법을 이용하였다.²⁴

EJ-1-68

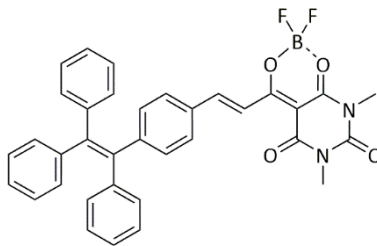


Figure 18. Structure of EJ-1-68.

(*E*)-2,2-difluoro-6,8-dimethyl-4-(3-(1,2,2-triphenylethyl)styryl)-2,8-dihydro-5*H*-1 λ^3 ,2 λ^4 -[1,3,2]dioxaborinino[6,5-*d*]pyrimidine-5,7(6*H*)-dione

EJ-1-48 (101.9mg, 0.28mmol, 1eq)와 1,2-dichloroethane (4mL)을 two neck round bottom flask에 넣고 교반한다. Piperidine (5 drops, 32.0uL)를 넣고 5분간 교반한 뒤, EJ-1-66 (88.5mg, 0.36mmol, 1.3eq)을 넣고 1.5시간동안 85℃로 가열하며 reflux한다. 1.5시간 뒤 TLC 확

인 (Hexane:DCM=1:3) 후 둥근 바닥 플라스크로 옮겨 고체가 생성될 때까지 감압 증류한다. (다홍색) 전개용매 Hexane:DCM=1:3 조건으로 silica gel column chromatography를 하여 정제한다. (오렌지 레드)

Yield : 44.4mg (26.7%) ESI-MS: m/z calcd. for $C_{35}H_{27}BF_2N_2O_4$ [M+H]⁺: 589.20; found: 589.1. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.46 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 8.23 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.16–7.06 (m, 11H), 7.05–6.97 (m, 6H), 3.69–3.50 (m, 3H), 3.41–3.34 (m, 3H), 1.56–1.49 (m, 4H). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 182.0, 159.3, 152.9, 149.5, 149.1, 143.3, 143.2, 143.0, 139.9, 132.4, 132.1, 131.4, 131.4, 131.4, 129.9, 128.8, 128.0, 128.0, 128.0, 127.9, 127.8, 127.2, 127.0, 118.6, 92.7, 29.8, 28.7. ¹⁹F-NMR (471 MHz, CDCl₃) δ -143.0, -143.1.

EJ-1-69

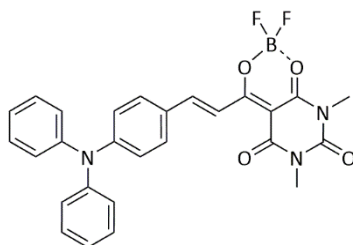


Figure 19. Structure of EJ-1-69.

(*E*)-4-(3-(diphenylamino)styryl)-2,2-difluoro-6,8-dimethyl-2,8-dihydro-5*H*-1 λ^3 ,2 λ^4 -[1,3,2]dioxaborinino[6,5-*d*]pyrimidine-5,7(6*H*)-dione

4-(diphenylamino)benzaldehyde (101.1mg, 0.37mmol, 1eq)와 1,2-dichloroethane (4mL)을 two neck round bottom flask에 넣고 교반한다. Piperidine (5 drops, 32.0uL)를 넣고 5분간 교반한 뒤, EJ-1-66 (111.1mg, 0.45mmol, 1.2eq)을 넣고 50분동안 85°C로 가열하며 reflux한다. 50분 뒤 TLC 확인 (Hexane:DCM=1:3) 후 둥근 바닥 플라스크로 옮겨 고체가 생성될 때까지 감압 증류한다. (밤색) 전개용매 Hexane:DCM=1:4 조건으로 silica gel column chromatography를 하여 정제한다. (어두운 적색) Yield : 37.1mg (20.0%) ESI-MS: m/z calcd. for C₂₇H₂₂BF₂N₃O₄ [M+H]⁺: 502.17; found: 502.1. ¹H NMR (500

MHz, CDCl₃) δ 8.37 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 8.29 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.35 (t, $J = 7.9$ Hz, 4H), 7.20–7.17 (m, 6H), 6.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 3.53 (s, 3H), 3.38 (s, 3H). ¹³C–NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 180.8, 166.5, 159.5, 153.6, 152.9, 149.3, 145.8, 132.7, 129.9, 126.5, 126.4, 125.6, 119.7, 114.9, 91.9, 29.7, 28.6. ¹⁹F–NMR (471 MHz, CDCl₃) δ -143.7, -143.7.

EJ-1-72

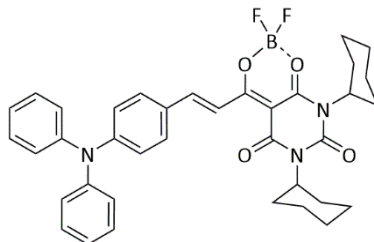


Figure 20. Structure of EJ-1-72.

(*E*)-6,8-dicyclohexyl-4-(3-(diphenylamino)styryl)-2,2-difluoro-2,8-dihydro-5*H*-1 λ ³,2 λ ⁴-[1,3,2]dioxaborinino[6,5-*d*]pyrimidine-5,7(6*H*)-dione

4-(diphenylamino)benzaldehyde (102.0mg, 0.37mmol, 1eq)와 1,2-dichloroethane (4mL)을 two neck round bottom flask에 넣고 교반한다. Piperidine (5 drops, 32.0uL)를 넣고 5분간 교반한 뒤, EJ-1-64 (172.2mg, 0.45mmol, 1.2eq)을 넣고 1시간 10분동안 85°C로 가열하며 reflux한다. 50분 뒤 TLC 확인 (Hexane:DCM=4:3) 후 둥근 바닥 플라스크로 옮겨 고체가 생성될 때까지 감압 증류한다. (밤색) 전개용매 Hexane:DCM=4:3 조건으로 silica gel column chromatography를 하여 정제한다. (어두운 적색) Yield : 162.9mg (68.5%) ESI-MS: m/z calcd. for C₃₇H₃₈BF₂N₃O₄ [M+H]⁺: 638.29; found: 638.2. ¹H-NMR (500

MHz, CDCl₃) δ 8.36 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 8.24 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 7.58–7.51 (m, 2H), 7.36–7.28 (m, 4H), 7.19–7.11 (m, 6H), 6.99–6.94 (m, 2H), 4.85–4.75 (m, 2H), 2.37–2.28 (m, 4H), 1.86 (t, $J = 14.0$ Hz, 4H), 1.75 (d, $J = 10.3$ Hz, 2H), 1.67–1.62 (m, 4H), 1.41–1.32 (m, 4H), 1.28–1.20 (m, 2H). ¹³C–NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 181.0, 159.8, 152.6, 148.6, 145.9, 132.4, 129.8, 129.6, 126.7, 126.4, 125.8, 125.4, 119.9, 115.8, 92.7, 57.8, 29.4, 28.8, 26.4, 26.4, 25.3, 25.0. ¹⁹F–NMR (471 MHz, CDCl₃) δ -144.5, -144.5.

2) 분광학적 특성 평가

프로브의 물리화학적 특성 평가는 Spectramax M5 Multi-Mode Microplate Reader와 crystal cuvette를 이용하였고, 가시광선 영역에서 spectrum mode 2nm 간격으로 측정하였다. Absorbance는 프로브를 첨가하지 않은 상태에서 용매만으로 먼저 reference data를 얻어 보정하였다. 이후 용매 1mL에 프로브 DMSO stock 25mM 1uL를 넣어 1:1000배 희석하였으며, 측정 최종농도는 $25 \mu\text{M}$ 이다. 같은 농도의 프로브 용액을 이용하여 Absorbance의 최대 흡광 파장 (λ_{abs})을 excitation 파장 (λ_{ex})으로 하여 emission scan을 한다. Fluorescence quantum yields는 아래의 식을 이용하여 계산하였고, Φ_f , F , f , n 은 각각 fluorescence quantum yield, absorbance at the excitation wavelength, area under the emission peak, refractive index of the solvent이다. x와 st는 각각 EJ-1-69와 Nile red (standard)이고, $\Phi_{f,\text{st}}$ 는 1,4-dioxane에서의 Nile red를 사용하였다.²⁹

$$\Phi_{f,x} = \Phi_{f,\text{st}} \times (F_x/F_{\text{st}}) \times (f_{\text{st}}/f_x) \times (n_x/n_{\text{st}})^2$$

3) 형광 현미경을 통한 세포 이미징

① HeLa cell을 이용한 cell permeability 확인

6 well plate에 HeLa cell을 9×10^4 cells/well이 되게 깐다. 24시간 후 기존의 media를 제거한 후 PBS 1mL로 wash 한다. Opti-MEM 1mL에 LFP-1, EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72 5mM DMSO stock 1 μ L를 1:1000 희석하여 각 well에 처리한다. 2시간동안 처리한 후 기존의 media를 제거하고 PBS 1mL로 wash한다. 새로운 Opti-MEM 1mL를 넣고 형광 현미경을 통해 세포를 확인한다.

② 3T3-L1 cell을 통한 LD 선택성 확인

3T3-L1 cell differentiation

3T3-L1 cell differentiation은 Sigma-Aldrich®사의 3T3-L1 differentiation kit (cat. DIF001)를 사용하였고, 해당 kit의 protocol을 따랐다. 분화 전, 25T flask에 preadipocyte medium (DMEM, 5% BCS, 1% P/S)를 사용하여 세포를 0.7×10^6 cells/flask만큼 깐다. 48시간 후, 오래된 media를 제거한 후, differentiation medium 5mL를 넣고 72시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조성으로 incubation한다. Differentiation medium은 DMEM/F12에 differentiation cocktail (1.5 μ g/mL insulin, 1 μ M dexamethasone, 500 μ M IBMX, 1 μ M rosiglitazone)을 1:1000로 희석

하고, 10% FBS와 1% P/S를 넣어 0.22 μ m syringe filter로 여과하여 사용하였다. 72시간 후, 오래된 media를 제거하고 maintain medium 5mL를 넣고, 10일동안 48시간 간격으로 media를 교체하면서 incubation시킨다. Maintain medium은 DMEM/F12에 Insulin을 1:1000로 희석하고, 10% FBS와 1% P/S를 넣어 0.22 μ m syringe filter로 여과하여 사용하였다.

3T3-L1 cell을 통한 LD 선택성 확인

Confocal dish에 70% 분화 완료된 3T3-L1 cell을 dish당 9×10^4 cells/dish 만큼 Maintain medium를 사용하여 간다. 24시간 뒤 오래된 media를 제거한 후 Opti-MEM 2mL에 EJ-1-69 0.5mM stock 2 μ L, BODIPY 493/503 0.2mM 2 μ L를 1:1000 희석하여 각 dish에 1시간동안 처리한다. 1시간 처리한 후 기존의 media를 제거하고 Opti-MEM 1mL로 wash한다. 새로운 Opti-MEM 1mL를 넣고 confocal microscope를 통해 세포를 확인한다.

HeLa cell을 통한 세포 내 지방 포식 확인

Confocal dish에 HeLa cell을 dish당 9×10^4 cells/dish 만큼 간다. 24시간 후 기존의 media를 제거한 후 PBS 1mL로 wash 한다. Oleic acid (OA)를 Opti-MEM 1mL에 200 μ M이 되도록 희석한 후, dish에 처리하여 6

시간동안 incubation한다. OA medium을 제거한 후 Opti-MEM 1mL에 최종 농도와 시간이 EJ-1-69 ($1\mu\text{M}$, 15min), BODIPY 493/503 (200nM, 1h), Mitotracker-Green (500nM, 15min), LysoTracker-Green ($1\mu\text{M}$, 5min)이 되도록 프로브 stock을 1:1000 희석하고 처리한다. 처리한 후 기존의 media를 제거하고 Opti-MEM 1mL로 wash한다. 새로운 Opti-MEM 1mL를 넣고 confocal microscope를 통해 세포를 확인한다.

HepG2 cell을 통한 간암 세포 내 LD 탐지 능력 평가

Confocal dish에 HepG2 cell을 dish당 $9 \times 10^4 \text{ cells/dish}$ 만큼 깐다. 24시간 후 기존의 media를 제거한 후 PBS 1mL로 wash 한다. Oleic acid (OA)를 Opti-MEM 1mL에 $200\mu\text{M}$ 이 되도록 희석한 후, dish에 처리하여 6시간동안 incubation한다. OA medium을 제거한 후 Opti-MEM 1mL에 EJ-1-69의 최종 농도가 $1\mu\text{M}$ 가 되도록 30분동안 처리한다. 처리한 후 기존의 media를 제거하고 Opti-MEM 1mL로 wash한다. 새로운 Opti-MEM 1mL를 넣고 confocal microscope를 통해 세포를 확인한다.

4) 세포 독성 평가

Cell proliferation assay

96 well plate에 HeLa cell을 1.3×10^4 cells/well 만큼 깐다. 24시간 후 오래된 media를 제거하고, probe와 Opti-MEM을 혼합한 media 200 μ L 를 넣고 24시간 동안 처리한다. (probe: EJ-1-68, EJ-1-69, EJ-1-72 / Control; DMSO, 0.1 μ M, 0.25 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M) 24시간 후, MTS solution을 well 당 20 μ L/well 만큼 넣고 2시간동안 incubation 한다. 2시간 후 다른 처리 없이 바로 490nm에서 흡광도를 측정한다. Cell viability percentage는 DMSO만 처리한 살아있는 세포의 흡광도를 100으로 잡고 계산한다.

$$\text{cell viability (\%)} = \frac{\text{treatment}}{\text{control}} \times 100$$

Trypan blue staining assay

6 well plate에 HeLa cell을 1.2×10^6 cells/well 만큼 깐다. 24시간 후, 오래된 media를 제거하고, EJ-1-69와 Opti-MEM을 혼합한 media 1mL 를 넣어준다. (control; DMSO, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M) 6시간 후, Opti-MEM/EJ-1-69 media를 제거한 후, PBS 1mL로 2번 wash 한다. Trypsin 0.2 mL를 넣고, 4분동안 incubation한다. Incubation 후,

0.8mL DMEM(10% FBS, 1% P/S)를 넣고 cell을 plate로부터 떼어내어 Ep tube에 담는다. Ep tube를 1200×RPM 으로 3분동안 centrifuge 시킨다. Cell pellet을 제외한 상층용액을 조심히 제거하고 DMEM 1mL로 거품이 생성되지 않게 희석한다. 희석 DMEM은 FPS나 BCS가 혼합되지 않은 것을 사용한다. 혼합된 cell suspension 1mL 중 10uL를 분주하여 trypan blue 10uL와 잘 섞어주고 Disposable Hemocytometer에 10uL를 주입한다. 현미경을 이용하여 grid 4개에 존재하는 염색이 되지 않은 세포 수를 각각 세어주고, 평균을 낸다. Cell viability percentage는 DMSO만 처리한 살아있는 세포 수를 100으로 잡고 계산한다.

$$\text{cell viability (\%)} = \frac{\text{treatment}}{\text{control}} \times 100$$

참고문헌

- 1 Holthuis, J. C. & Menon, A. K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature* 510, 48–57, doi:10.1038/nature13474 (2014).
- 2 Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. & Fujimoto, T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* 277, 44507–44512, doi:10.1074/jbc.M207712200 (2002).
- 3 Olzmann, J. A. & Carvalho, P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 137–155, doi:10.1038/s41580-018-0085-z (2019).
- 4 Sztalryd, C. & Brasaemle, D. L. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, 1221–1232, doi:10.1016/j.bbalip.2017.07.009 (2017).
- 5 Ingelmo-Torres, M. *et al.* Hydrophobic and basic domains target proteins to lipid droplets. *Traffic* 10, 1785–1801, doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00994.x (2009).
- 6 Khandelia, H., Duelund, L., Pakkanen, K. I. & Ipsen, J. H.

- Triglyceride blisters in lipid bilayers: implications for lipid droplet biogenesis and the mobile lipid signal in cancer cell membranes. *PLoS One* 5, e12811, doi:10.1371/journal.pone.0012811 (2010).
- 7 Walther, T. C., Chung, J. & Farese, R. V., Jr. Lipid Droplet Biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33, 491–510, doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060608 (2017).
- 8 Gallardo-Montejano, V. I. *et al.* Nuclear Perilipin 5 integrates lipid droplet lipolysis with PGC-1 α /SIRT1-dependent transcriptional regulation of mitochondrial function. *Nat Commun* 7, 12723, doi:10.1038/ncomms12723 (2016).
- 9 Cohen, J. C., Horton, J. D. & Hobbs, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332, 1519–1523, doi:10.1126/science.1204265 (2011).
- 10 Drummen, G. P. Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques—illuminating biological and biomedical research. *Molecules* 17, 14067–14090, doi:10.3390/molecules171214067 (2012).
- 11 Gao, M., Yu, F., Lv, C., Choo, J. & Chen, L. Fluorescent chemical probes for accurate tumor diagnosis and targeting therapy. *Chem Soc Rev* 46, 2237–2271, doi:10.1039/c6cs00908e (2017).

- 12 P Greenspan, E. P. M., S D Fowler. Nile red: A Selective fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. *J Cell Biol* 100, 965–973, doi:10.1083/jcb.100.3.965 (1985).
- 13 Li, G. *et al.* A BODIPY–Based Fluorogenic Probe for Specific Imaging of Lipid Droplets. *Materials (Basel)* 13, doi:10.3390/ma13030677 (2020).
- 14 Gerasov, A. O., Zyabrev, K. V., Shandura, M. P. & Kovtun, Y. P. The structural criteria of hydrolytic stability in series of dioxaborine polymethine dyes. *Dyes and Pigments* 89, 76–85, doi:10.1016/j.dyepig.2010.09.007 (2011).
- 15 Polishchuk, V. M. & Shandura, M. P. Polymethine Dyes Based on 2,2–Difluoro–1,3,2–dioxaborine: a Minireview. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry* 20, 27–53, doi:10.24959/ophcj.22.271882 (2023).
- 16 Polishchuk, V., Stanko, M., Kulinich, A. & Shandura, M. D– π –A– π –D Dyes with a 1,3,2- Dioxaborine Cycle in the Polymethine Chain: Efficient Long- Wavelength Fluorophores. *European Journal of Organic Chemistry* 2018, 240–246, doi:10.1002/ejoc.201701466 (2018).
- 17 Grabowski, Z. R., Rotkiewicz, K. & Rettig, W. Structural Changes

- Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge–Transfer States and Structures. *Chemical Reviews* 103, 3899–4032, doi:10.1021/cr9407451 (2003).
- 18 Zhang, F. *et al.* Emerging designs of aggregation–induced emission luminogens for lipid droplets imaging. *Coordination Chemistry Reviews* 493, doi:10.1016/j.ccr.2023.215337 (2023).
- 19 Chen, H. *et al.* Execution of aggregation–induced emission as nano–sensors for hypochlorite detection and application for bioimaging in living cells and zebrafish. *Talanta* 214, 120842, doi:10.1016/j.talanta.2020.120842 (2020).
- 20 Li, S. *et al.* In situ generation of photoactivatable aggregation–induced emission probes for organelle–specific imaging. *Chem Sci* 9, 5730–5735, doi:10.1039/c8sc01887a (2018).
- 21 Sun, Z., Liu, Y., Guan, P., Yang, B. & Liu, B. Near–infrared dual–functional AIEgens for lipid droplets imaging in multispecies and photodynamic therapy. *Dyes and Pigments* 185, doi:10.1016/j.dyepig.2020.108884 (2021).
- 22 Xu, W. *et al.* Facile synthesis of AIEgens with wide color tunability for cellular imaging and therapy. *Chem Sci* 10, 3494–3501,

- doi:10.1039/c8sc05805a (2019).
- 23 Zhang, X. *et al.* Light-Up Lipid Droplets Dynamic Behaviors Using a Red-Emitting Fluorogenic Probe. *Anal Chem* 92, 3613–3619, doi:10.1021/acs.analchem.9b04410 (2020).
- 24 Choi, N. E., Kim, E. J. & Lee, J. A fluorescent molecular rotor for the in situ imaging of latent fingerprints. *RSC Adv* 12, 33180–33186, doi:10.1039/d2ra06728e (2022).
- 25 Gomez-Lechon, M. J. *et al.* A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 165, 106–116, doi:10.1016/j.cbi.2006.11.004 (2007).
- 26 Cruz, A. L. S., Barreto, E. A., Fazolini, N. P. B., Viola, J. P. B. & Bozza, P. T. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis* 11, 105, doi:10.1038/s41419-020-2297-3 (2020).
- 27 Collot, M. *et al.* Ultrabright and Fluorogenic Probes for Multicolor Imaging and Tracking of Lipid Droplets in Cells and Tissues. *J Am Chem Soc* 140, 5401–5411, doi:10.1021/jacs.7b12817 (2018).
- 28 Zhang, X. *et al.* End-group effects of piezofluorochromic aggregation-induced enhanced emission compounds containing distyrylanthracene. *Journal of Materials Chemistry* 22,

doi:10.1039/c2jm33140c (2012).

- 29 Sackett, D. L. & Wolff, J. Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. *Anal Biochem* 167, 228–234, doi:10.1016/0003-2697(87)90157-6 (1987).

ABSTRACT

Development of AIE-based molecular rotors and their applications in molecular imaging

Eun Ji Kim

Department of Next Generation Applied
Sciences

Graduate School of

Sungshin University

Fluorescence imaging is a method for simplifying the visualization of cellular or tissue functions and pathological information. Among various methods, chemically synthesized probes have been developed as more accessible tools than other fluorescence imaging methods. In this study,

fluorescent probes targeting Lipid Droplets (LD), which play a crucial role in cellular metabolism, were synthesized and evaluated. Building upon the donor–acceptor structure of the precursor probe LFP–1, substitutions in the fluorescent moiety and dioxaborine–barbiturate core were made to enhance fluorescence intensity and cellular permeability. The synthesized probes demonstrated over 100–fold increase in fluorescence intensity and improved cellular permeability. To confirm selective targeting of LD within actual cells, the shapes and dynamic changes of LD were observed in various cell lines, and performance comparison with commercial probes was conducted. The fluorescent probes developed in this study can serve as valuable tools for effectively confirming the functions and changes of LD within cells. Additionally, they hold potential for application as diagnostic tools in pathological conditions such as cancer and metabolic disorders.