

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Syntéza multifunkčních fluorescenčních sond pro
detekci proteázy a peroxidu vodíku**

Bakalářská práce

Autor práce:	Julie Rožková
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.
Konzultant:	MSc. David Miličević, Ph.D.

Olomouc 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Jana Hlaváče, Ph.D., a že jsem všechny použité zdroje a literaturu citovala a uvedla v seznamu použité literatury. Tato práce nebyla použita k získání jiného nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace. Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Litovli dne 9. 5. 2023

Rožková Julie

Poděkování

Největší poděkování patří mému vedoucímu práce prof. RNDr. Janu Hlaváčovi, Ph.D., za jeho cenné rady, ochotu a trpělivost, kterou se mnou po celou dobu práce měl, a navíc za jeho nekončící optimismus, kterým mě motivoval pracovat dál i navzdory bezvýhodným situacím, se kterými jsme se potýkali. Poděkování nesmí chybět konzultantovi MSc. Davidu Miličevićovi, Ph.D., za jeho odborné vedení v experimentální části bakalářské práce. Dále chci poděkovat našemu výzkumnému týmu za vřelé přijetí do kolektivu a za poskytnutou pomoc, kdykoliv jsem ji potřebovala.

Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory grantu Interní Grantové Agentuře Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2023_20 (2023)).

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Julie Rožková
Název práce:	Syntéza multifunkčních fluorescenčních sond pro detekci proteáz a peroxidu vodíku
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra Organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Školitel:	prof. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.
Konzultant:	MSc. David Miličević, Ph.D.
Rok obhajoby:	2023

Abstrakt:

Bakalářská práce se zaměřuje na návrh a syntézu multifunkčních fluorescenčních sond pro simultánní detekci peroxidu vodíku a proteáz trypsinu a chymotrypsinu, která je založena na štěpení peptidového linkeru danou proteázou a hetero Diels-Alderovou reakcí katalyzovanou peroxidem vodíku. Teoretická část se zabývá problematikou metabolismu peroxidu vodíku, navíc obsahuje přehled vybraných vyvinutých fluorescenčních sond pro detekci peroxidu vodíku či proteáz trypsinu/chymotrypsinu za posledních 15 let. Ve výsledkové části je popsána syntéza sond a vyskytující se komplikace, a nakonec jsou diskutovány výsledky fluorescenčních měření reflektujících přítomnost proteázy a peroxidu vodíku.

Klíčová slova:	Fluorescenční sonda, peroxid vodíku, trypsin, chymotrypsin, syntéza peptidů na pevné fázi
Počet stran:	115
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Julie Rožková

Title: Synthesis of multifunctional fluorescent probes for detection of protease and hydrogen peroxide

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Organic chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

Advisor: prof. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Consultant: MSc. David Miličević, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract:

The bachelor's thesis focuses on the design and synthesis of multifunctional fluorescent probes for the simultaneous detection of hydrogen peroxide and the proteases trypsin and chymotrypsin, which is based on the cleavage of the peptide linker by the protease and the hetero Diels-Alder reaction catalyzed by hydrogen peroxide. The theoretical part deals with the issue of hydrogen peroxide metabolism, in addition it contains an overview of selected fluorescent probes developed for the detection of hydrogen peroxide or proteases trypsin/chymotrypsin over the last 15 years. In the results section, the synthesis of probes and occurring complications are described, and finally the results of fluorescence measurements reflecting the presence of protease and hydrogen peroxide are discussed.

Key words: Fluorescent probe, hydrogen peroxide, trypsin, chymotrypsin, solid-phase peptide synthesis

Number of pages: 115

Language: Czech

Obsah

Seznam zkratk	9
Úvod	11
Cíle práce	13
Teoretická část	14
1. Peroxid vodíku a jeho význam v buněčném metabolismu	14
1.1 Generace peroxidu vodíku v buňce	15
1.1.1 Neenzymatická tvorba peroxidu vodíku	15
1.1.2 Enzymatická tvorba peroxidu vodíku	16
1.2 Degradace peroxidu vodíku v buňce	19
1.3 Interakce peroxidu vodíku s proteázami	21
2. Oxidace hydroxylaminů peroxidem vodíku	22
3. Fluorescenční sondy	24
3.1 Fluorescenční sondy pro detekci peroxidu vodíku	25
3.2 Fluorescenční sondy pro detekci trypsinu a chymotrypsinu	31
Výsledky a diskuze	38
4. Příprava sond	39
4.1 První část syntézy	39
4.2 Zkušební štěpení intermediátů proteázami	41
4.2.1 Štěpení trypsinem	41
4.2.2 Štěpení chymotrypsinem	45
4.3 Druhá část syntézy	48
4.3.1 Postup A	48
4.3.2 Postup B	50
4.3.3 Postup C	53
4.3.4 Postup D	54

4.3.5	Postup E	59
4.3.6	Postup F.....	63
4.3.7	Postup G.....	66
4.4	Zkušební hetero Diels-Alderova reakce na modelovém systému	70
4.4.1	Katalyzátor	70
4.4.2	Detekce peroxidu vodíku	71
5.	Fluorescenční měření	73
5.1	Základní charakteristika	75
5.2	Fotostabilita	77
5.2.1	První část sondy – molekula E.....	77
5.2.2	Druhá část sondy – molekula RhB1	80
5.3	Teplotní závislost.....	80
5.4	Odezva na přítomnost trypsinu.....	82
5.5	Odezva na přítomnost peroxidu vodíku	84
	Experimentální část.....	90
6.	Přístrojové vybavení a metody	90
7.	Příprava sond	91
7.1	Příprava vzorků pro LC/MS analýzu.....	91
7.2	Příprava sloučenin dle Schématu 2.....	91
7.3	Příprava sloučenin dle Schématu 3.....	92
7.4	Příprava sloučenin dle Schématu 4.....	93
7.5	Příprava sloučenin dle Schématu 5.....	94
7.6	Příprava sloučenin dle Schématu 6 a 7.....	95
7.7	Příprava sloučenin dle Schématu 9.....	96
7.8	Příprava sloučenin dle Schématu 10.....	97
7.9	Příprava sloučenin dle Schématu 12.....	98
7.10	Příprava sloučenin dle Schématu 13.....	99

7.11	Příprava sloučenin dle Schématu 14.....	100
7.12	Příprava sloučenin dle Schématu 16.....	101
7.13	Odštěpení sloučenin z pryskyřice.....	102
8.	Zkušební štěpení prekurzorů 5A-D proteázami.....	103
9.	Zkušební hetero Diels-Alderova reakce na modelovém systému.....	104
10.	Fluorescenční měření	104
10.1	Základní fluorescenční charakteristika sloučenin E a RhB1	104
10.2	Fotostabilita sloučenin E a RhB1	105
10.3	Měření teplotní závislosti sloučeniny E	105
10.4	Odezva sondy E na přítomnost trypsinu.....	106
10.5	Odezva sloučenin E a RhB1 na přítomnost peroxidu vodíku.....	106
Závěr	107
Použitá literatura	109

Seznam zkratek

acac	acetylaceton
AcOH	kyselina octová
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
CAT	kataláza
DCM	dichlormethan
Dde	1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyklohex-1-yliden)ethyl
DEAC	3-karboxy-7-(diethylamino)kumarin, kumarin D
DIC	diisopropylkarbodiimid
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOH	ethanol
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
FITC	fluorescein isothiokyanát
Fmoc	fluorenylmethyloxykarbonyl
GPx	glutathionperoxidáza
GSH	glutathion
hmpa	triamid kyseliny hexamethylfosforečné
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>in situ</i>	v místě
<i>in vitro</i>	ve zkumavce (v laboratorních podmínkách)
<i>in vivo</i>	v živém organismu
LC/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
MeOH	methanol
Mtt	4-methyltrityl
NIR	blízké infračervené záření

NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidon
PEG	polyethylenglykol
POM	paraoxon methyl
Prx	peroxiredoxin
PS	polystyren
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
rt	pokožová teplota
SOD	superoxiddismutáza
TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TBDMSCl	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl chlorid
TFA	trifluoroctová kyselina
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
XO	xanthinoxidáza

Úvod

Živé organismy se skládají z množství různých buněk obsahující obrovské množství biomolekul, jejichž koncentrace, chemické modifikace a interakce jsou obecně přesně řízeny a regulovány. Jedním z cílů molekulární biologie je rozluštění přesného fungování tohoto složitého systému interagujících molekul jak uvnitř, tak mezi buňkami. Protože jak biomolekuly, tak i ostatní částice v živé buňce není možno pozorovat přímo, vědci se musí spoléhat na speciální technologie a přístupy, které je informují o chování sledovaných molekul.¹

Metody, kterými lze „vidět do těla“ nebo „vidět do buněk“, jsou nezbytné jak pro diagnostiku a léčbu nemocí, tak pro studium nejrůznějších životních procesů uvnitř buněk, či celých organismů. Jelikož je žádoucí, aby použité metody byly neinvazivní, stávají se techniky pro vizualizaci fyziologických a patofyziologických změn v těle a buňkách stále důležitějšími v biomedicínských vědách.²

Mezi nejrozšířenějšími metodami detekce těchto změn dominuje fluorescenční spektroskopie. Fluorescenční zobrazování oproti jiným technologiím, jako je například radioizotopové značení, zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) či elektrochemická detekce, má pro tento účel mnoho výhod. Poskytuje vysoce citlivou, méně invazivní a bezpečnou detekci použitím snadno dostupných nástrojů s rychlou odezvou. Fluorescenční sondy založené na organických molekulách se dnes staly nepostradatelnými nástroji v moderní chemické biologii, protože poskytují dynamické informace týkající se lokalizace a množství sledovaných molekul. Předpokládá se, že metody využívající fluorescenční sondy, budou i v budoucnu hrát ústřední roli v oblasti studia intracelulárních a jiných procesů s aplikacemi jak v akademické sféře, tak též v průmyslu.^{1,2}

V současné době existuje obrovské množství fluorescenčních sond, které slouží k detekci a stanovení například kationtů kovů (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} atd.)^{3,4,5}, sacharidů⁶, aktivit různých enzymů⁷, reaktivních forem kyslíku (ROS)⁸, reaktivních forem dusíku (RNS)⁹, aniontů¹⁰ či pH¹¹. Takovéto sondy můžeme dále rozlišit podle toho, jestli detekují jeden či více sledovaných parametrů zároveň. Multifunkční fluorescenční sondy jsou třídou sond, které rozpoznávají dvě nebo více látek současně pomocí jedné molekuly.

Takové sondy jsou zajímavější než senzory reagující na jeden analyt, díky jejich simultánním a diskriminačním změnám barva/emise v přítomnosti analytů. To jde obvykle ruku v ruce s hospodárností, s menší spotřebou času a větší jednoduchostí a efektivitou analytických metod. Na druhou stranu konstrukce multifunkčních fluorescenčních sond pro biologické zobrazování má ve srovnání s monofunkčními sondami jedinečné požadavky a při jejich aplikaci je třeba překonat řadu problémů spojených například s interferencí.¹²

Názorným příkladem úspěšné multifunkční fluorescenční sondy je bifunkční sonda Mito-CM-BP, navrhnutá a připravená skupinou Zhang a spol.¹³, která slouží pro přesnou a citlivou detekci glutathionu (GSH) a SO₂. V rakovinových buňkách sonda odhalila způsob produkce SO₂ metabolismem GSH, díky čemuž poskytla jednoduchý a účinný nástroj pro klinickou diagnostiku a léčbu rakoviny plic.

Důležitým analytem sledovaným v mnoha biochemických procesech je peroxid vodíku (H₂O₂) jako neradikálová reaktivní forma kyslíku generovaná během mnoha (pato)fyziologických podmínek. V závislosti na svém časoprostorovém akumulacním profilu může tato molekula působit jako signální posel nebo způsobit oxidační poškození. Stanovení buněčného H₂O₂ je tedy klíčové pro další pochopení fyziologických a patologických procesů úzce souvisejících s intracelulárním H₂O₂.¹⁴

Produkce ROS je spouštěna vystavením buňky různým stresovým a cytotoxickým stimulům, mezi něž patří například i vysoké koncentrace serinových proteáz. Aoshiba a spol.¹⁵ se zabývali touto problematikou a dokázali, že proteázou indukované zvýšení ROS přispívá k cytotoxicitě, protože buněčná smrt vyvolaná proteázami byla zmírněna ošetřením katalázou, která rozkládá H₂O₂, a urychlena přidavkem aminotriazolu, inhibítorem katalázy. Avšak nepotvrdili, zda proteázy stimulují specifickou signalizaci ke zvýšení hladin ROS.

Ve své bakalářské práci se věnuji návrhu a přípravě modelových multifunkčních fluorescenčních sond, které mají reflektovat zvýšenou koncentraci peroxidu vodíku a proteolytických enzymů trypsinu a chymotrypsinu.

Cíle práce

Cílem bakalářské práce je syntéza navržených multifunkčních fluorescenčních sond pro detekci přítomnosti peroxidu vodíku a proteáz trypsinu a chymotrypsinu za pomoci standardní peptidové syntézy na pevné fázi. Sonda má být složena ze dvou částí. Na koncích řetězce první části mají být navázána dvě fluorescenční barviva a na druhé části pak bude navázáno třetí barvivo. Detekce peroxidu vodíku je založena na hetero Diels-Alderově reakci indukované peroxidem vodíku mezi dvěma částmi sondy. Dále má sonda obsahovat specifické místo ve struktuře, kde dochází ke štěpení linkeru odpovídajícím enzymem. Zjednodušený princip fungování sond představuje Schéma 1.

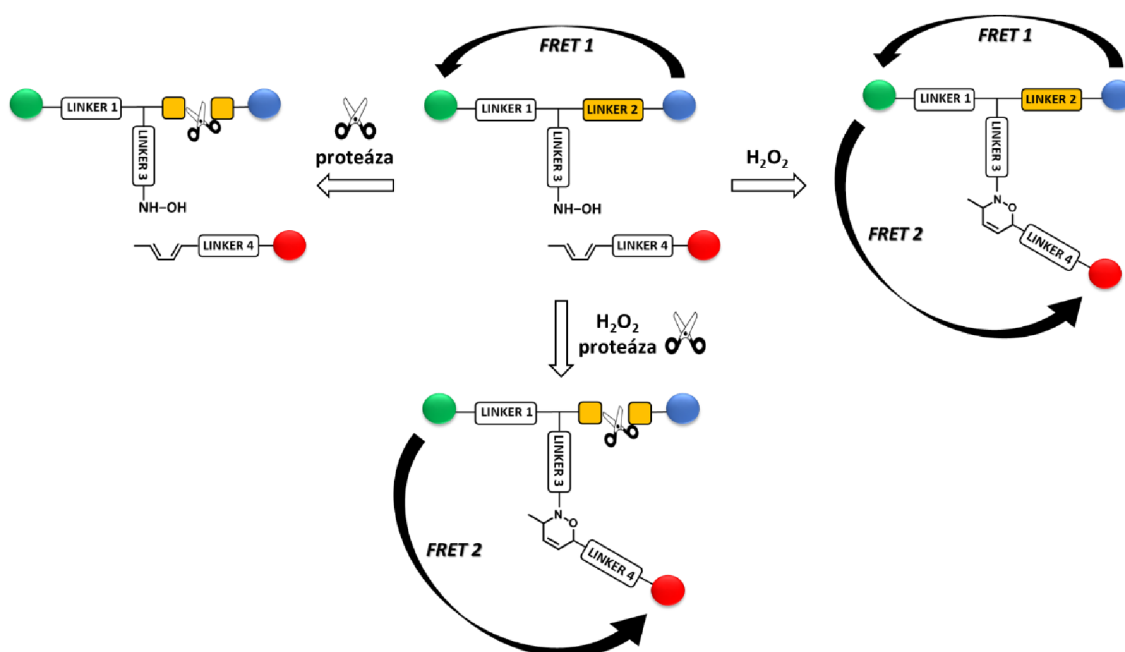


Schéma 1: Obecný princip fungování multifunkčních fluorescenčních sond.

Jednotlivé dílčí cíle bakalářské práce pak zahrnují:

1. vyvinutí jednoduché a reprodukovatelné syntézy vedoucí k přípravě sond
2. přípravu a vyčištění sond v dostatečném množství
3. ověření fluorescenčních vlastností vybrané sondy
4. ověření fluorescenčních vlastností sondy v přítomnosti peroxidu vodíku
5. ověření fluorescenčních vlastností sondy v přítomnosti enzymu.

Teoretická část

1. Peroxid vodíku a jeho význam v buněčném metabolismu

Všechny živé systémy fungující v aerobních podmínkách obsahují reaktivní formy kyslíku (ROS), což je třída radikálových nebo neradikálových látek obsahujících kyslík.¹⁶ Radikály obsahují jeden nebo více nepárových elektronů, a patří mezi ně superoxid, hydroxylový radikál nebo singletový kyslík. Mezi neradikálové deriváty kyslíku se řadí peroxid vodíku a kyselina chlorná.¹⁷

Fyziologické koncentrace ROS jsou prospěšné, zajišťují buněčné signální dráhy a ochranu před invazivními patogeny.¹⁸ Avšak při špatné regulaci se ROS mohou hromadit a zapříčinit tak oxidační stres v buňkách. Oxidativně poškozují buněčné proteiny, nukleové kyseliny a lipidové molekuly, čímž přispívají k předčasnému stárnutí a chorobným stavům spojených s věkem jako jsou například neurodegenerativní poruchy, diabetes či rakovina. Z tohoto důvodu si organismy vyvinuly molekulární systémy, včetně antioxidačních metaloenzymů jako superoxidodismutáza (SOD, EC 1.15.1.1) a kataláza (CAT, EC 1.11.1.6), a také řadu redoxních párů na bázi thiolů, aby vychtaly a neutralizovaly nadbytek ROS jakožto možnou hrozbu pro buňku.¹⁹

Peroxid vodíku, jeden z nejdůležitějších zástupců ROS, je přirozený metabolit vyskytující se v aerobních organismech. Hraje důležitou roli jako marker oxidačního stresu a intracelulární druhý posel při přenosu signálu. Může aktivovat signální dráhy mnoha biologických procesů jako je buněčná proliferace a diferenciací, oprava tkání, zánět, cirkadiánní rytmus a stárnutí. Signální vlastnosti může peroxid vodíku projevat díky své relativní stabilitě, vysoké rychlosti difúze a selektivní reaktivitě. Funkce peroxidu vodíku v buňce závisí zejména na jeho lokální koncentraci, kinetice jeho produkce a eliminace a na přítomnosti dalších částic v jeho okolí. Například v přítomnosti volných redoxně aktivních kovových iontů mohou netoxické fyziologické hladiny peroxidu vodíku vést ke vzniku vysoce toxických hydroxylových radikálů. Tyto reaktivní

radikály pak bez rozdílu oxidují prakticky jakoukoliv organickou molekulu, se kterou se setkají.^{14,20}

1.1 Generace peroxidu vodíku v buňce

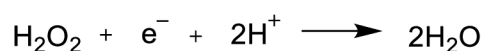
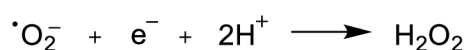
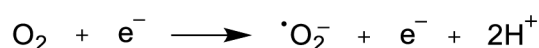
Již více než 60 let je známo, že se peroxid vodíku tvoří přirozeně v živých organismech. Hlavním zdrojem jeho tvorby je enzymaticky katalyzovaná dismutace superoxidového aniontového radikálu. Dále je vedlejším produktem dvou-elektronové redukce molekulárního kyslíku v reakcích katalyzovaných oxidázami, jako jsou například xantinoxidáza (XOR), acyl-CoA oxidáza (EC 1.3.3.6), oxidáza D-aminokyselin (EC 1.4.3.3) a další.²¹

V savčích buňkách koexistují dvě formy produkce peroxidu vodíku, definované jako enzymatická a neenzymatická tvorba.

1.1.1 Neenzymatická tvorba peroxidu vodíku

V mitochondriální matrix dochází k tvorbě ROS částečnou redukcí kyslíku na superoxidový aniontový radikál, který je následně redukován elektrony za přítomnosti protonů na peroxid vodíku a konečným produktem je voda (Obr. 1). Gibbsova volná energie tohoto redukčního procesu je v každém kroku negativní.²¹

Elektrony ve vnitřní membráně mitochondrií putují přes komplexy dýchacího řetězce a energie tohoto procesu se využívá k pumpování protonů do mezimembránového prostoru a tím k vytvoření elektrochemického protonového gradientu. Díky vysokému gradientu tyto protony slouží jako pohon pro mitochondriální ATP syntázu (EC 7.1.2.2.), která syntetizuje ATP z ADP v procesu zvaném oxidativní fosforylace. Protony přivedené ATP syntázou zpět do matrix mitochondrie jsou použity u posledního kroku dýchacího řetězce při redukcí molekulárního kyslíku na superoxidový aniontový radikál, peroxid vodíku a nakonec na vodu (Obr. 1).²¹



Obr. 1: Redukce kyslíku na vodu přes stadium reaktivních forem kyslíku.²¹

1.1.2 Enzymatická tvorba peroxidu vodíku

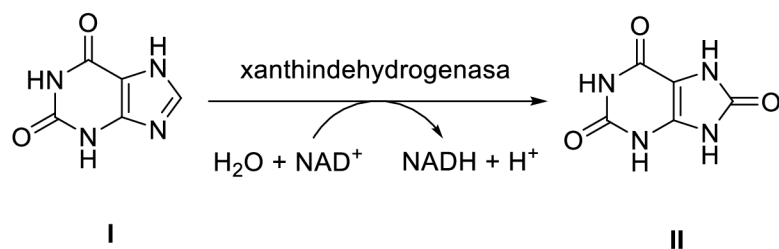
Enzymatická dráha začíná tvorbou superoxidového aniontového radikálu, který je enzymem SOD převeden na peroxid vodíku. SOD je jediný enzym schopný detoxifikovat superoxidový aniontový radikál a je přítomný v mitochondriích, cytoplazmě i v extracelulárním prostoru. U savců existují tři izoformy tohoto enzymu (SOD1, SOD2 a SOD3). SOD1 (Cu/Zn SOD) je převládajícím lapačem superoxidového aniontového radikálu a je lokalizován v cytoplazmě, mitochondriálním mezimembránovém prostoru, jádře a lysozomech. SOD2 (Mn SOD) a SOD3 (Cu/Zn SOD) jsou lokalizovány v mitochondriích a extracelulární matrix. Tato skupina metaloenzymů katalyzuje dismutaci superoxidového aniontového radikálu na peroxid vodíku a kyslík.²¹

Superoxidový aniontový radikál se kromě v mitochondriích tvoří enzymatickými reakcemi i v dalších organelách jako endoplazmatické retikulum, peroxisomy a cytosol.²² Peroxisomy obsahují celou řadu enzymů, které generují ROS jako vedlejší produkty jejich normální katalytické aktivity (Tab. 1).²³

Tab. 1: Příklady lidských peroxisomálních enzymů generujících peroxid vodíku jako vedlejší produkt.²³

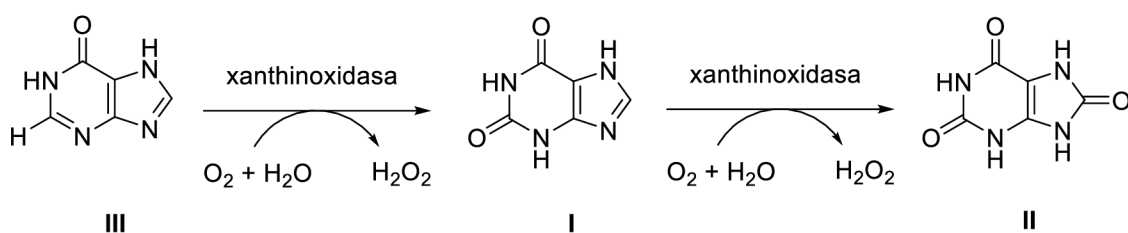
Enzym produkující ROS	Zkratka enzymu	Klasifikace enzymu
Palmitoyl-CoA oxidáza	ACOX1	EC 1.3.3.6
Trihydroxykoprostanoyl (THC)-CoA oxidáza	ACOX2	
Pristanoyl-CoA oxidáza	ACOX3	
D-aminokyselinová oxidáza	DAO	EC 1.4.3.3
D-aspartát oxidáza	DDO	EC 1.4.3.1
L-pipekolát oxidáza	PIPOX	EC 1.5.3.7
Oxidáza L- α -hydroxykyselin 1	HAO1	EC 1.1.3.15
Oxidáza L- α -hydroxykyselin 2	HAO2	
Polyaminová oxidáza	PAOX	EC 1.5.3.17
Xanthinoxidáza	XOR	EC 1.17.3.2

Dva z nejvýznamnějších zdrojů peroxidu vodíku odvozeného od peroxisomů jsou xanthinoxidáza a acyl-CoA oxidáza. Xanthinoxidáza (XOR) existuje ve dvou odlišných konfiguracích, jako xanthindehydrogenáza (XDH, EC 1.17.1.4) a xanthinoxidáza (XO, EC 1.17.3.2). Xanthindehydrogenáza oxiduje xanthin na kyselinu močovou za současné redukce oxidovaného nikotinamidadeninukleotidu (NAD^+) na jeho redukovanou formu NADH (Obr. 2).²³



Obr. 2: Oxidační reakce xanthinu (I) na kyselinu močovou (II) za katalýzy xanthindehydrogenasou.²¹

Naproti tomu xanthinoxidáza katalyzuje nejdříve oxidaci hypoxanthinu na xanthin a poté xanthin na kyselinu močovou, což jsou poslední dva kroky katabolismu purinů (Obr. 3). Enzym XO dodává elektrony přímo molekulárnímu kyslíku, a tak generuje superoxidový aniontový radikál a peroxid vodíku jednoelektronovou nebo dvou-elektronovou redukcí. Relativní množství superoxidového aniontového radikálu a peroxidu vodíku generované enzymem XO závisí na množství molekulárního kyslíku, pH a koncentraci purinů. Za normálních fyziologických podmínek je hlavním reaktivním produktem odvozeným z redukce kyslíku katalyzované XO peroxid vodíku.²⁴

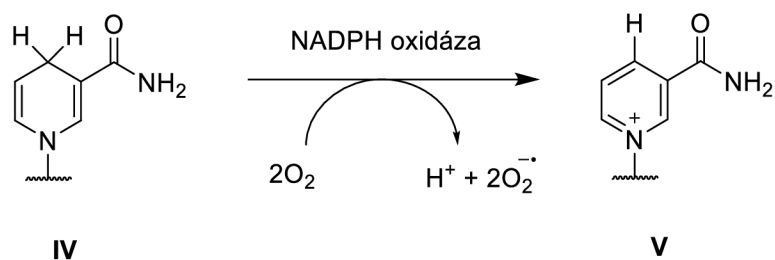


Obr. 3: Oxidační reakce hypoxanthinu (III) na xanthin (I) a nakonec kyselinu močovou (II) za katalýzy xanthinoxidázou.²¹

Druhým již zmiňovaným enzymem produkujícím peroxid vodíku je acyl-CoA oxidáza. V savčích buňkách probíhá β -oxidace lipidů jak v peroxisomech, tak v mitochondriích. Peroxisomy jsou nezbytné pro β -oxidaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem a

rozvětvených mastných kyselin, které nelze v mitochondriích odbourat. Během prvního kroku peroxisomální β -oxidace lipidů jsou peroxisomy závislé na dvou formách acyl-CoA oxidáz generujících peroxid vodíku. Jsou to palmitoyl-CoA oxidáza, která oxiduje mastné kyseliny s dlouhým řetězcem esterifikované koenzymem A, a pristanoyl-CoA oxidáza, která štěpí mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem esterifikované koenzymem A. Oba enzymy způsobují desaturaci acyl-CoA mastných kyselin za vzniku 2-trans-enoyl-CoA, s vedlejším produktem tvorby H_2O_2 . Bylo zjištěno, že lidé mají tři izoformy acyl-CoA oxidázy: palmitoyl-CoA oxidázu (ACOX1), trihydroxykoprostanoyl (THC)-CoA oxidázu (ACOX2) a pristanoyl-CoA oxidázu (ACOX3).²³

Dalšími významnými zdroji superoxidového aniontového radikálu je enzym NADPH oxidáza (EC 1.6.3.1) a některé enzymy ze superrodiny cytochromů P450. NADPH oxidáza katalyzuje redukční reakci molekulárního kyslíku na superoxidový aniontový radikál za pomoci redukovaného NADPH jako donoru elektronů (Obr. 4). Takto produkované ROS vedou k eliminaci napadajících patogenů a slouží jako zánětlivý mediátor. NADPH oxidáza má tedy význam v imunitním systému organismu.^{21,25}



Obr. 4: Celková reakce tvorby superoxidového aniontového radikálu z NADPH (IV).

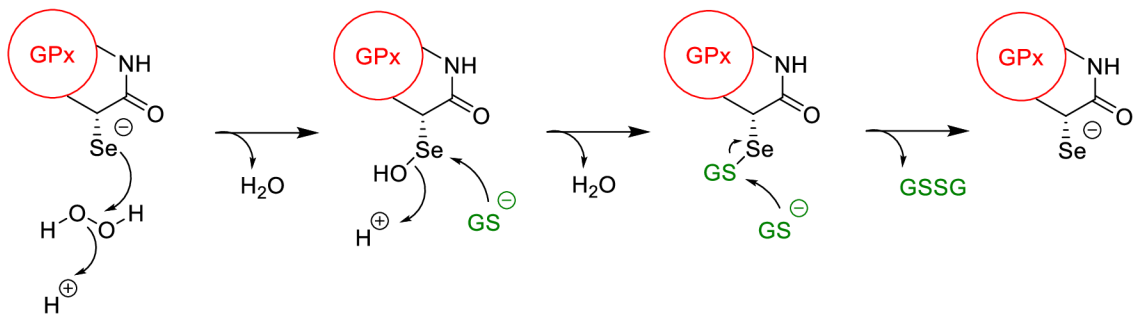
Enzymy ze superrodiny cytochromů P450, zodpovědné za detoxifikaci látek v těle, mohou provádět oxidační reakce, které vedou ke vzniku ROS.²¹ Příkladem je oxidace ethanolu prostřednictvím cytochromu P450 2E1 (CYP2E1; EC 1.14.13.n7), kdy dochází k tvorbě superoxidového aniontového radikálu nebo peroxidu vodíku v případě, že vazba substrátu, molekulárního kyslíku a dárce elektronů (NADPH) není během katalýzy úzce koordinována. CYP2E1 je podstatně aktivnější v produkci ROS než jiné enzymy cytochromu P450.^{26,27}

Přítomnost enzymů, jejichž aktivita vede k tvorbě superoxidového aniontového radikálu a peroxidu vodíku, tedy naznačuje, že produkce těchto molekul není náhodnou událostí, a tudíž musí mít v buňce, kromě způsobení poškození, i jiný specifický účel.²¹

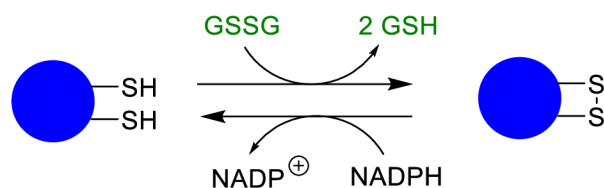
1.2 Degradace peroxidu vodíku v buňce

Jak je uvedeno výše, při špatné regulaci se ROS mohou hromadit a způsobit tak oxidační stres v buňkách. Aby se minimalizovaly škody způsobené vysokým oxidačním stresem, peroxizomy používají jednoduchou, ale účinnou strategii – veškerý superoxidový aniontový radikál převést na peroxid vodíku, a ten co nejúčinněji odstranit tak rychle, jak se tvoří. Superoxidový aniontový radikál je v peroxizomech enzymem SOD převáděn na peroxid vodíku, který je následně eliminován enzymy katalázou (CAT), glutathionperoxidázou (GPx, EC 1.11.1.9) nebo peroxiredoxinem (Prx, EC 1.11.1.24).²³

Glutathionperoxidáza se nachází v cytosolu a mitochondriích a je hlavním antioxidačním systémem při nízkých úrovních oxidačního stresu. Izoformy GPx lze rozdělit na selen-dependentní a selen-nezávislé. U selen-nezávislých izoform atom Se není zapojen do katalytické reakce. Naopak izoforma Se-dependentní GPx, se skládá ze čtyř podjednotek nesoucí atom Se v aktivním místě navázaný na aminokyselinu cystein a spolupracuje s GSH. GPx přeměňuje peroxid vodíku na vodu oxidací dvou molekul redukovaného GSH za vzniku dimerní formy GSSG spojenou přes disulfidické můstky (Obr. 5). Produkovaný GSSG je potřeba zpět redukovat na dvě molekuly GSH, a to se děje za pomoci enzymu glutathionreduktázy, který využívá NADPH jako zdroj elektronů (Obr. 6).²¹

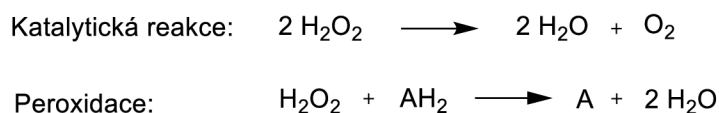


Obr. 5: Katalytický cyklus Se-dependentní GPx.²¹



Obr. 6: Katalytický cyklus glutathionreduktázy.²¹

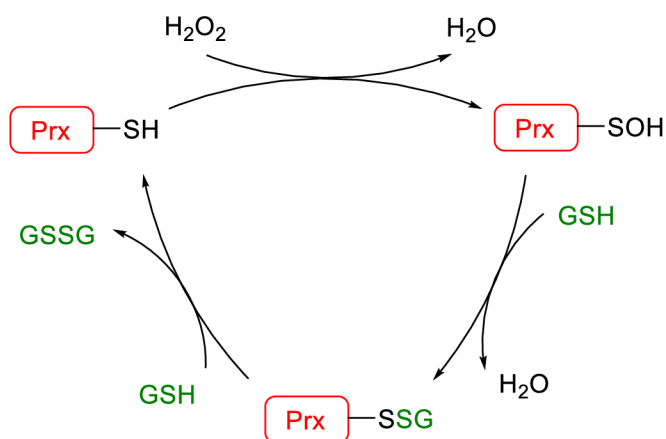
CAT je antioxidační enzym nacházející se ve většině aerobních organismů. Jedná se o homotetramerní enzym, který obsahuje čtyři vazebné pozice pro NADPH. CAT obsahuje ve svém aktivním místě hemovou skupinu, která má za úkol realizovat dvě reakce (Obr. 7): přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík (katalytická reakce) a oxidaci metabolických donorů vodíku, jako jsou například alifatické alkoholy s krátkým řetězcem nebo kyselina mravenčí, prostřednictvím rozkladu peroxidu (peroxidace).^{14,21}



Obr. 7: Možné cesty redukce peroxidu vodíku pomocí CAT.

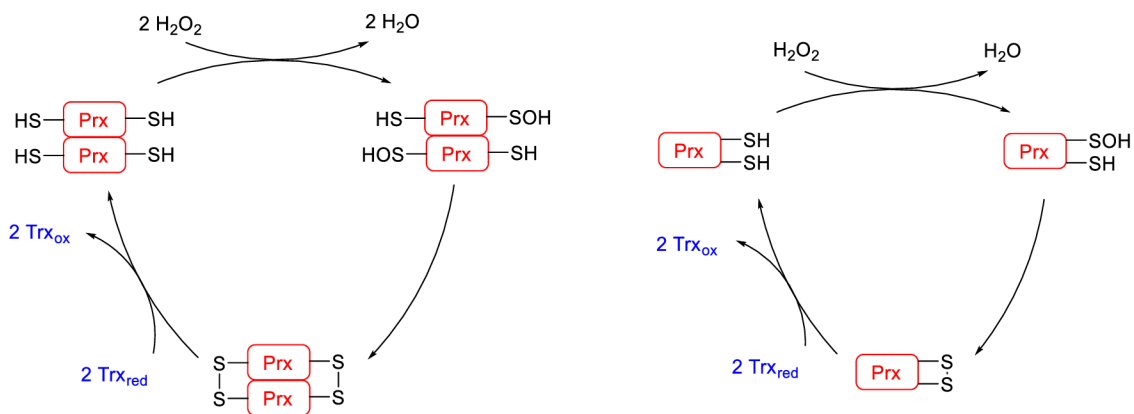
Koncentrace přítomných donorů vodíku a rychlost tvorby peroxidu budou rozhodovat o tom, která reakce bude preferovanější. Mechanismus katalytické reakce je dvou-krokový a využívá dvě molekuly peroxidu vodíku, kdy jedna působí jako donor elektronu a druhá jako akceptor.¹⁴

Peroxiredoxiny jsou velkou rodinou antioxidačních thiol-dependentních peroxidáz, které v závislosti na izoformě štěpí H_2O_2 , různé hydroperoxydy a peroxydusitany na vodu, alkoholy a dusitany.²³ Lze je rozdělit do tří tříd: 1-Cys-Prx, typické 2-Cys-Prx a atypické 2-Cys-Prx. U všech izoform dochází při reakci s H_2O_2 k oxidaci thiolové skupiny cysteinu za vzniku kyseliny sulfenové Prx-S-OH. V případě izoformy 1-Cys-Prx je Prx-S-OH redukována pomocí GSH za tvorby dimeru GSSG stejným mechanismem jako u glutathionperoxidázy (Obr. 8).²¹



Obr. 8: Katalytický cyklus izoformy 1-Cys-Prx.²¹

Izoformy typického 2-Cys-Prx fungují na základě kombinované aktivity dvou monomerů obsahujících v aktivním místě dvě molekuly cysteinu (Obr. 9, nalevo). Při peroxidázové reakci je jeden cystein obou monomerů oxidován a neoxidovaný cystein napadá Prx-S-OH druhého monomeru za vzniku stabilního intermolekulárního disulfidového můstku. Můstek je pak redukován použitím redukovaného thioredoxinu Trx jako zdroje elektronů. Atypické 2-Cys-Prx fungují principiálně stejně jako ty typické, jediným rozdílem je, že jde o monomery se dvěma cysteiny v jedné podjednotce, což vede k tvorbě intramolekulární disulfidické vazby (Obr. 9, napravo).^{21,23}



Obr. 9: Katalytický cyklus typického (vlevo) a atypického (vpravo) 2-Cys-Prx.²¹

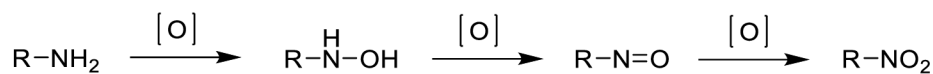
1.3 Interakce peroxidu vodíku s proteázami

V současné době existují studie^{15,28}, které dokazují, že serinové proteázy zvyšují oxidační stres v buňkách, což ukazuje na přímou interakci mezi proteázami a ROS vedoucí k výsledné cytotoxicitě.

Aoshiba a spol.¹⁵ se zabývali studií účinku několika serinových proteáz na hladiny ROS plicních fibroblastů a bronchiálních epitelálních buněk. Výsledky provedených experimentů dokázaly, že vysoké koncentrace neutrofilní elastázy, trypsinu a pronázy vyvolávají nárůst ROS, včetně peroxidu vodíku, a že jejich zdrojem jsou pravděpodobně mitochondrie. Jde o první studii, která dokázala, že serinové proteázy přímo zvyšují intracelulární hladiny ROS v nefagocytických buňkách.

2. Oxidace hydroxylaminů peroxidem vodíku

Účinná a přímá syntéza nitrososloučenin je předmětem zkoumání posledních let, protože se jedná o cenné chemické meziprodukty vyskytující se v různých metabolických procesech a jsou široce používané při chemických syntézách, jako jsou například Diels-Alderovy cykloadice²⁹, adice Grignardových činidel³⁰ a syntéza indolů³¹ a azoarenů³². Využívané způsoby přípravy nitrososloučenin zahrnují přímou nitrosaci arenů³³, oxidaci primárních aminů nebo hydroxylaminů³⁴, a nakonec redukci nitroderivátů³⁵. Oxidace primárních aminů katalyzovaná kovem v přítomnosti peroxidu vodíku je nejčastějším způsobem syntézy C-nitrososloučenin.³⁶ Naopak, oxidace hydroxylaminů na nitrososloučeniny pomocí peroxidu vodíku v literatuře popsána není. Jelikož hydroxylaminy jsou intermediáty při oxidaci aminů na nitrososloučeniny, a proto lze předpokládat podobnou reaktivitu, budu se v této kapitole zabývat oxidací primárních aminů, která je široce prozkoumána a publikována.^{35,37} Oxidace primárních aminů na nitrosoderiváty probíhající přes hydroxylamin je znázorněna na Obr. 10.

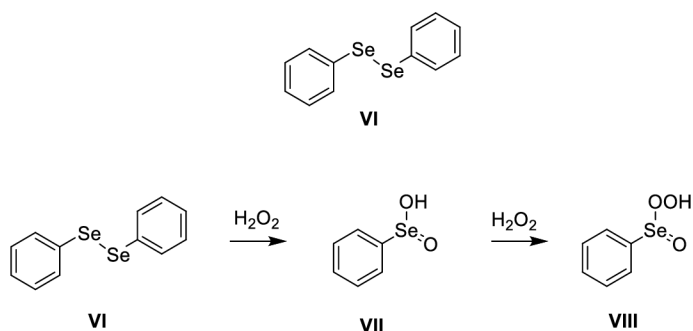


Obr. 10: Oxidace primárních aminů.

Pro oxidaci primárních aminů na nitrososloučeniny byly popsány reakce s H_2O_2 jako oxidačním činidlem v přítomnosti katalyzátorů oxidů rhenia, wolframu, molybdenu nebo selenu.³⁷ Sakaue a spol.³⁸ použili 35% H_2O_2 v přítomnosti fosforečnanu peroxowolframového k oxidaci aromatických aminů jako je například anilin a 4-methylanilin za vzniku příslušných nitrosoderivátů. Dalšími účinnými katalyzátory obsahujícími oxidy molybdenu a rhenia jsou například $[\text{Mo}(\text{O})(\text{O}_2)_2(\text{H}_2\text{O})(\text{hmpa})]$, *cis*- $\text{Mo}(\text{O})_2(\text{acac})_2$ a methyltrioxorhenium.³⁵

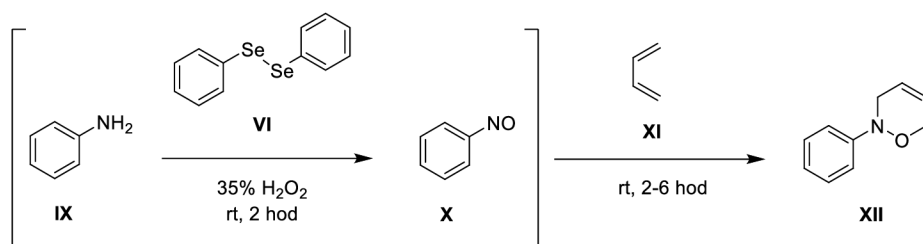
Priewisch a spol.³² udělali srovnávací studii ohledně schopnosti methyltrioxorhenia (MTO), Na_2WO_4 a SeO_2 katalyzovat oxidaci methyl-4-aminobenzoátu pomocí H_2O_2 na příslušný nitrosoderivát. Za katalýzy MTO získali pouze směs odpovídajících molekul azoxybenzenu a nitrobenzenu po 19 hodinách. Katalýza Na_2WO_4 a SeO_2 byla úspěšnější, povedlo se jim připravit nitrosoderivát s obsahem 80 %, ale s reakčními časy kolem 20 hodin.

Tyto katalytické oxidace pomocí oxidů rhenia, wolframu, molybdenu a selenu jsou často pomalé, což může vést k tvorbě vedlejších dimerních produktů, jako jsou azoderiváty nebo azoxyderiváty, nebo také k oxidaci až na nitrosloučeniny. Skupina Zhao a spol.³⁷ vyvinula účinnou a selektivní oxidaci primárních aromatických aminů na nitrososloučeniny H_2O_2 katalyzovanou difenyldiselenidem **VI** (Obr. 11), která probíhá při laboratorní teplotě pouze 1-2 hodiny. Vycházeli ze skutečnosti, že diselenidy se dají snadno oxidovat H_2O_2 na kyselinu seleninovou **VII** nebo peroxyseleninovou **VIII**, které fungují jako extrémně účinná oxidační činidla pro další oxidace (Obr. 11).³⁹



Obr. 11: Katalyzátor difenyldiselenid a jeho oxidace H_2O_2 .

Navíc popsali postup syntézy oxazinů, jakožto produktů hetero Diels-Alderovy reakce (HDA), z primárních aromatických aminů, H_2O_2 a konjugovaných dienů v jednom kroku. Do *in situ* vytvořeného roztoku nitrosobenzenu ze selenidem katalyzované oxidace anilinu H_2O_2 byla přidána řada konjugovaných dienů a tvorba oxazinu probíhala hladce během 2-6 hodin při laboratorní teplotě (Obr. 12).³⁷

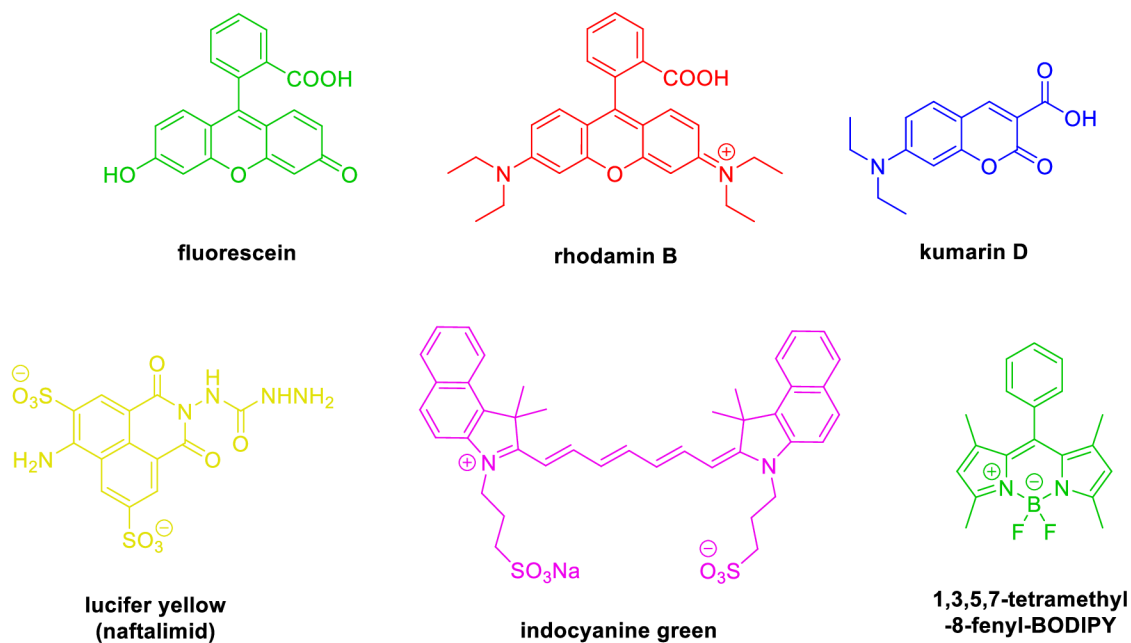


Obr. 12: Generování nitrosobenzenu **X** *in situ* z anilinu **IX** peroxidem vodíku za katalýzy difenyldiselenidem **VI** pro následnou HDA reakci s konjugovaným dienem **XI**.³⁷

3. Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy založené na malých organických molekulách se staly nepostradatelnými nástroji v moderní chemické biologii. Oproti technikám založených na radioaktivitě, bioluminiscenci, elektromagnetismu a elektrochemii splňují důležité podmínky jako jsou dostatečná citlivost pro fyziologické koncentrace (většinou mikro až nanomolární), dostatečné časové a prostorové rozlišení pro analýzu dynamických buněčných signalizačních procesů, neinvazivnost metody, a nakonec cenová dostupnost komponent.^{1,40}

Pro konstrukci různých typů fluorescenčních sond se využívá velké množství organických molekul, které vykazují fluorescenci různých vlnových délek. Zvláště důležité jsou barviva na bázi xanthenu, jako je fluorescein či rhodamin B, nebo kumarinu jako je například kumarin D. Jsou velmi oblíbené díky svým vynikajícím fotofyzikálním vlastnostem (dobrá rozpustnost ve vodě a fotostabilita) a dostupnosti. Další využívané fluoreskující molekuly jsou cyaninová a naftalimidová barviva, a poměrně nové BODIPY deriváty (Obr. 13).^{40,41,42}

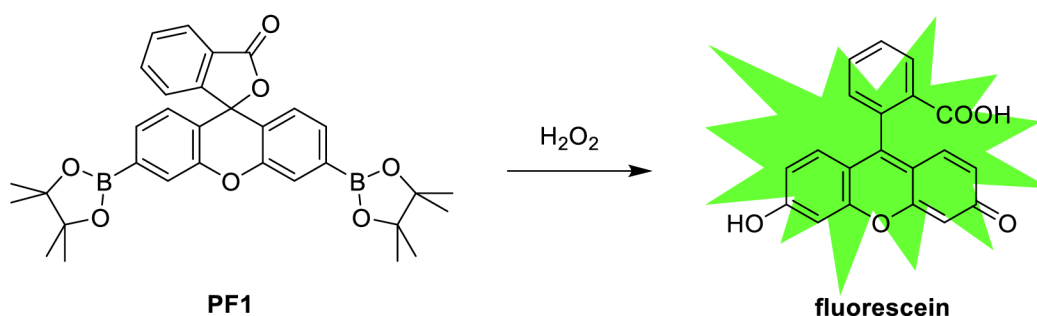


Obr. 13: Struktury vybraných fluorescenčních barviv (barva molekul zhruba zobrazuje jejich barvu emise).^{40,42}

3.1 Fluorescenční sondy pro detekci peroxidu vodíku

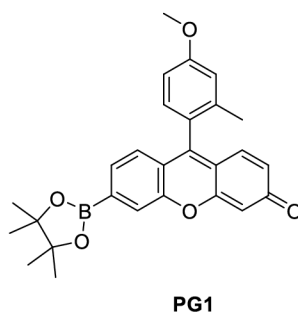
Jak bylo zmíněno v kapitole 1, peroxid vodíku patřící do skupiny ROS je důležitým produktem metabolismu kyslíku. Nicméně při jeho špatné regulaci se může akumulovat a způsobit oxidační stres uvnitř buněk, což přispívá ke stárnutí buněk a chorobným stavům jako jsou kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění nebo i cukrovka či rakovina. Stanovení buněčného H_2O_2 je tedy klíčové pro další pochopení fyziologických a patologických procesů onemocnění úzce souvisejících s intracelulárním H_2O_2 .¹⁹ Bylo navrženo a syntetizováno mnoho fluorescenčních sond pro detekci H_2O_2 na fyziologických hladinách, jejichž příklady uvádím dále.

V roce 2011 Lippert a spol.¹⁹ představili studii detekce H_2O_2 v živých systémech využívající oxidaci arylboronátů na fenoly za pomoci peroxidu vodíku. V první generaci těchto sond připravili sondu **PF1** (Obr. 14), pro kterou využili boronátem maskovanou molekulu fluoresceinu. Boronáty v polohách 3 a 6 nutí molekulu zůstat ve své uzavřené laktonové formě, ve které dochází k eliminaci fluorescenčních vlastností. Reakce sondy **PF1** s H_2O_2 přeměnila boronáty na fenoly se současným otevřením laktonu, což vedlo k mnohonásobnému zvýšení intenzity fluorescence (Obr. 14). Podstatné bylo zjištění, že tato reakce je selektivní vůči H_2O_2 oproti ostatním ROS.



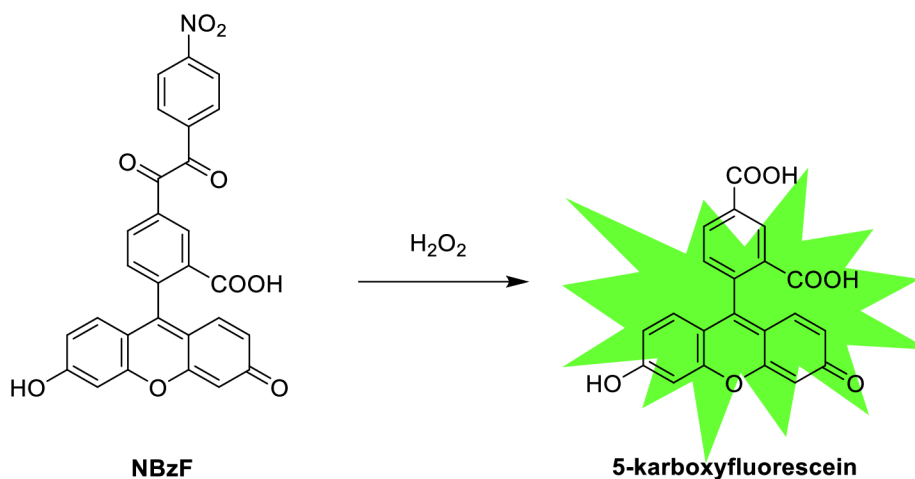
Obr. 14: Selektivní detekce H_2O_2 sondy **PF1** pomocí oxidace boronátových skupin.¹⁹

Ačkoliv sondy první generace byly schopné zobrazovat exogenně přidaný H_2O_2 na úrovních oxidačního stresu, pokusy využít je pro endogenní produkce H_2O_2 nebyly úspěšné kvůli jejich relativně nízké citlivosti. Za účelem zvýšit jejich citlivost připravili tito autoři sondu **PG1** (Obr. 15), která obsahuje pouze jednu boronátovou skupinu a vyžaduje tedy reakci pouze jediného ekvivalentu H_2O_2 k získání fluorescenčního produktu. Díky této sondě **PG1** poskytli přímý důkaz o tom, že H_2O_2 je endogenně produkován během buněčné signalizace, a také prokázali, že strategii s boronátovou reaktivitou lze využít k objasnění rolí H_2O_2 v biologických systémech.¹⁹



Obr. 15: Sonda druhé generace **PG1**.¹⁹

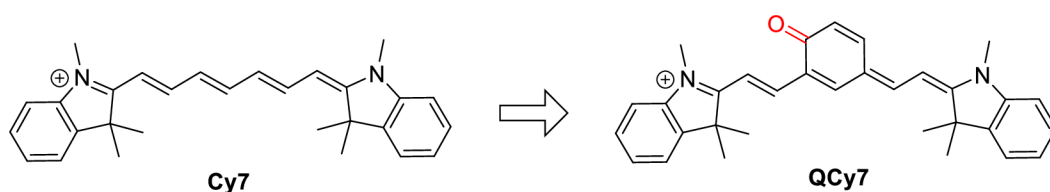
V tomtéž roce Abo a spol.⁴³ navrhli a syntetizovali fluorescenční sondy principiálně založené na specifické reaktivitě benzilu s H_2O_2 k řízení fluorescence. Navržený skelet 5-benzoylkarbonylfluorescein byl založen na myšlence, že tato struktura má nízkou fluorescenční kvantovou účinnost v důsledku zhašení fluorescence, avšak reakcí s H_2O_2 se přemění na 5-karboxyfluorescein, který je vysoce fluorescenční (Obr. 16). Mezi syntetizovanými deriváty poskytla sonda **NBzF** vysoce specifickou a citlivou detekci s rychlou odezvou. Praktickou hodnotu sondy **NBzF** potvrdili jejím použitím k detekci tvorby endogenního H_2O_2 v živých makrofázích RAW 264.7 a buňkách lidského epidermoidního karcinomu A431.⁴³



Obr. 16: Selektivní detekce H_2O_2 sondy **NBzF** pomocí oxidace benzilu.⁴³

Karton-Lifshin a spol.⁴⁴ se zabývali vývojem fluorescenčních sond pro zobrazování v blízké infračervené oblasti (NIR), protože umožňuje spolehlivou detekci molekulární aktivity *in vivo* díky dobré prostupnosti NIR světla přes organické tkáně a nízkému autofluorescenčnímu pozadí. Pro NIR zobrazování jsou jako fluorescenční značky široce používána cyaninová barviva díky jejich velkému extinkčnímu koeficientu a relativně

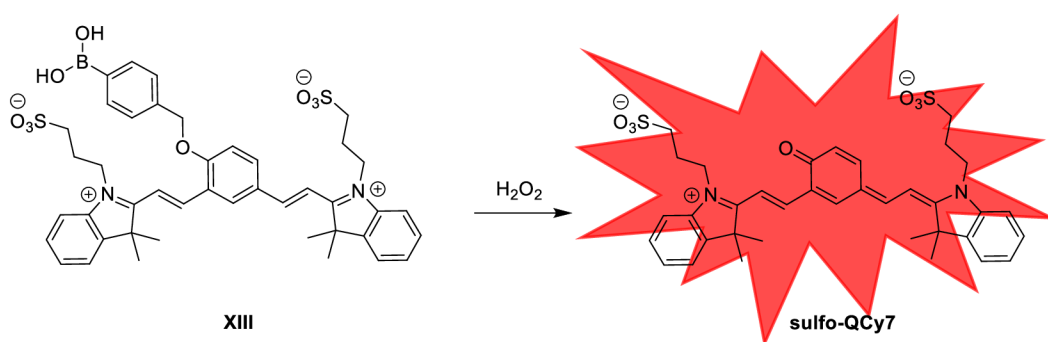
dobrým kvantovým výtěžkům. Tato výzkumná skupina chtěla vyvinout „OFF-ON“ sondu, která bude fluoreskovat až po kontaktu s detekovaným analytem. Pro vytvoření „turn ON“ systému pro molekulu cyaninu se obvykle používá systém na bázi FRET, a tudíž by bylo potřeba přidat do molekuly další barvivo. Tomu se jim podařilo elegantně vyhnout modifikací barviva **Cy7** za zisku chinonového derivátu **QCy7** (Obr. 17), který má podobný vzor konjugace jako **Cy7**, a proto také emitoval fluorescenci v NIR. Zavedení různých chránících skupin na fenol molekuly **QCy7** by mělo umožnit maskování NIR fluorescence, a naopak pokud se tyto spouštěče z molekuly odstraní, získá se volný fluorofor a tím se obnoví fluorescence.



Obr. 17: Navržené a syntetizované barvivo **QCy7** podle předlohy cyaninu **Cy7**.

Červeně vyznačená karbonylová skupina znázorňuje místo pro navázání spouštěče.⁴⁴

Řešením tohoto problému je sonda **XIII** konstrukce založená na struktuře připravené modifikace cyaninu **QCy7** (Obr. 18). Sonda **XIII** má prostřednictvím etherové vazby připojenou fenylboronovou kyselinu k sulfonovanému derivátu **QCy7**. Inkubace sondy **XIII** s H_2O_2 za fyziologických podmínek vedla k uvolnění aktivního fluoroforu **sulfo-QCy7** (Obr. 18).⁴⁴

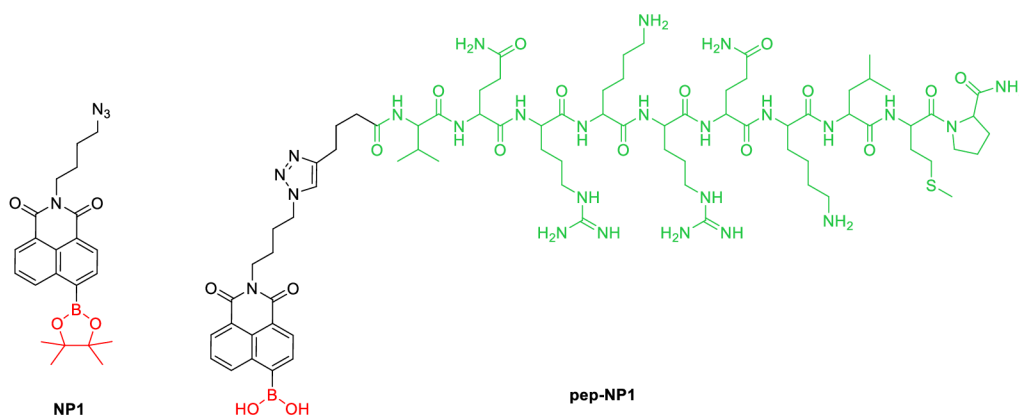


Obr. 18: Detekce H_2O_2 s využitím sondy **XIII** založená na oxidaci kyseliny fenylboronové.⁴⁴

Z hlediska praktického využití prokázali, že sonda **XIII** účinně zobrazuje endogenní H_2O_2 produkovaný v modelu akutního zánětu u myši. Pozitivní je i fakt, že syntéza jejího

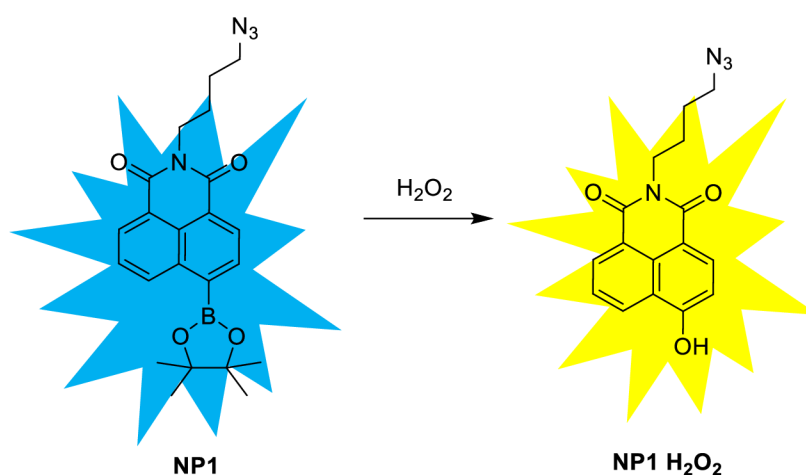
intermediátu **QCy7** je pouze dvou-kroková a lze ji použít k přípravě i jiných sond pro detekci a zobrazování různých analytů či enzymů.⁴⁴

Wen a spol.²⁰ v roce 2014 publikovali práci, ve které zkoumali způsoby detekce cytoplazmatického a jaderného H_2O_2 v živých buňkách. Jako výsledek vyvinuli vysoce citlivou a poměrovou fluorescenční sondu **NP1** na bázi 1,8-naftalimidu a esteru kyseliny borité (Obr. 19). Poměrové sondy mají výhodu duální fluorescence, čili na spektru mají dva dobře oddělené emisní pásy s odlišnými maximy vlnových délek. Poměr maxim se mění na přítomnosti (koncentraci) peroxidu vodíku. A proto je snadné na základě změn v intenzitě těchto maxim určit, zda se intracelulární koncentrace H_2O_2 mění. To umožňuje přesnější měření a kvantitativní analýzu nezávisle na koncentraci sondy.



Obr. 19: Sondy **NP1** a **pep-NP1** pro detekci cytoplazmatického a jaderného H_2O_2 .

Zeleně je vyznačená sekvence peptidu jaderného lokalizačního signálu.²⁰

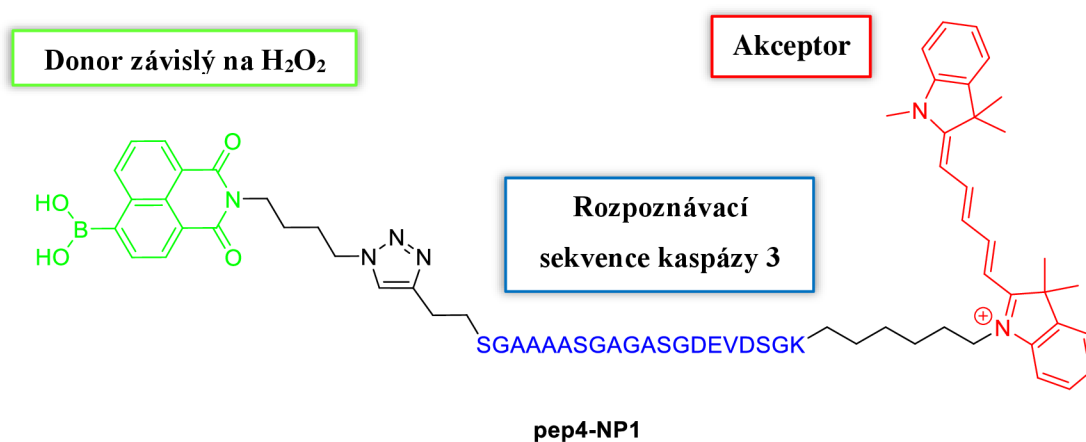


Obr. 20: Detekce H_2O_2 sondou **NP1** pomocí oxidace boronátu.²⁰

Sonda **NP1** byla dostatečně citlivá, aby detekovala endogenní H_2O_2 generovaný v živých makrofázích RAW 264.7 prostřednictvím buněčné zánětlivé reakce a v buňkách lidského

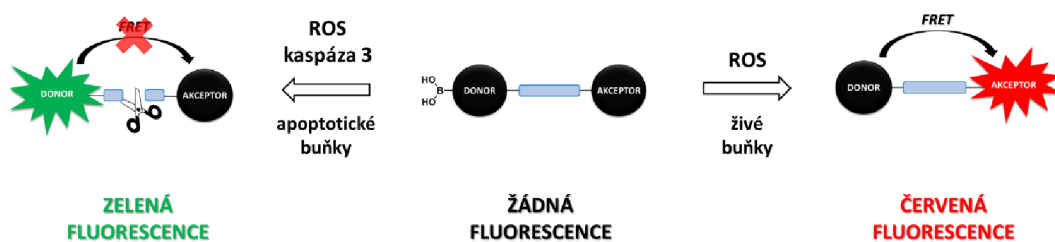
epidermoidního karcinomu A431 stimulací epidermálního růstového faktoru (Obr. 20). Navíc obsahuje azidovou skupinu navázanou na naftalimidovém skeletu, díky čemuž má potenciál ke spojení s různými molekulami prostřednictvím „click“ reakce. Toho využili k navázání sondy **NP1** na peptid specificky se akumulující v buněčném jádru za vzniku sondy **pep-NP1** (Obr. 19). Díky tomu byla fluorescenční sonda úspěšně zacílena do jádra a byla schopna poměrově detekovat jaderný H_2O_2 v živých buňkách.²⁰

V roce 2017 Wen a spol.⁴⁵ otevřeli diskuzi o potřebě pochopení provázaného vztahu mezi abnormální produkcí ROS a iniciací apoptózy v živých systémech. Toho chtěli docílit současným dynamickým monitorováním obou těchto biologických dějů. Publikovali studii, kde navrhli a syntetizovali fluorescenční sondu **pep4-NP1** (Obr. 21), která dokázala současně detekovat H_2O_2 a kaspázu 3, tedy příslušné markery ROS a apoptózy. Sonda **pep4-NP1** byla vyvinuta na základě řízené strategie Försterova rezonančního přenosu energie (FRET). Jako donor pro FRET použili 1,8-naftalimidovou skupinu (**NP1**) a jako akceptor použili červené emisní cyaninové barvivo, jehož absorpční pás se částečně překrývá s emisí **NP1** po reakci s H_2O_2 . Donor a akceptor jsou spojeni specifickým peptidem jako rozpoznávacím substrátem pro kaspázu 3.



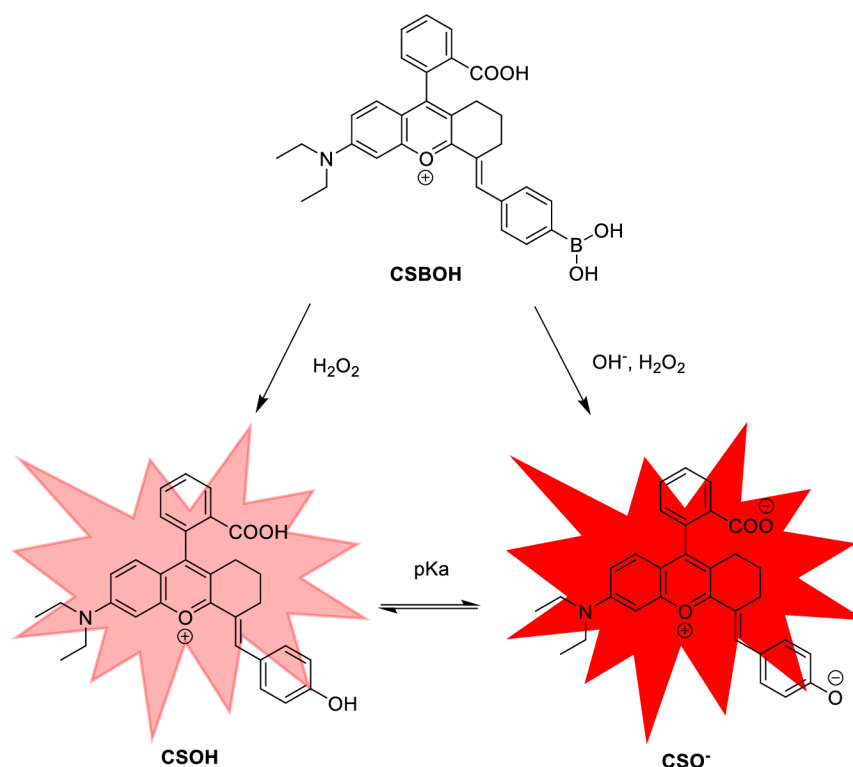
Obr. 21: Fluorescenční sonda **pep4-NP1**.⁴⁵

Konformace molekuly **pep4-NP1** zaručuje efektivní proces FRET po reakci s H_2O_2 v nepřítomnosti kaspázy 3, tedy v živých buňkách. Nicméně nadměrná exprese kaspázy 3 v apoptotických buňkách inhibovala FRET, protože peptidový řetězec byl štěpen kaspázou 3 (Obr. 22). Tudíž jediná sonda úspěšně produkovala fluorescenci při výrazně odlišných vlnových délkách v živých (červená fluorescence) a apoptotických (zelená fluorescence) buňkách při sledování změn hladiny H_2O_2 .⁴⁵



Obr. 22: Obecné schéma principu fungování duální sondy **pep4-NP1**.

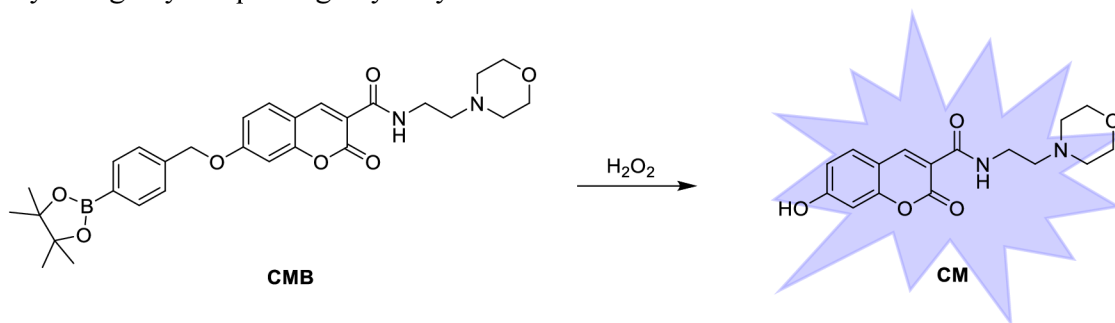
V roce 2016 se Liu a spol.⁴⁶ jako první věnovali studiu fluorescenční detekce H_2O_2 v alkalických podmínkách. Podávají několik důvodů, proč zobrazovat H_2O_2 ve slabě alkalickém prostředí. Za prvé je reaktivita H_2O_2 mnohem vyšší v alkalickém prostředí než v neutrálním nebo kyselém, takže nadbytek H_2O_2 je agresivnější a destruktivnější pro organely a tkáně v alkalickém prostředí. Za druhé, lidské tělo je obecně slabě alkalický biologický systém – například hodnota pH krevní plazmy je 7,35–7,45, hodnota pH v oblasti mitochondrie je přibližně 8,0 a hodnoty v tlustém střevě a slinivce jsou vyšší než 8,0. Liu a spol. tedy uvádí první příklad poměrové NIR fluorescenční sondy **CSBOH** pro detekci H_2O_2 v alkalickém prostředí (Obr. 23).



Obr. 23: Detekce H_2O_2 pomocí sondy **CSBOH** založené na substituci fenyloboronové kyseliny.⁴⁶

Fluorescence **CSBOH** byla zhášena skupinou kyseliny borité a reakcí s H_2O_2 za tvorby sloučeniny **CSOH** se fluorescenční signál obnovil. Buněčné experimenty ukázaly, že **CSBOH** dokáže zobrazit endogenně generovaný H_2O_2 v makrofázích RAW 264.7 prostřednictvím buněčné zánětlivé reakce a v buňkách lidského epidermoidního karcinomu A431 stimulací epidermálního růstového faktoru. Dále byla sonda **CSBOH** úspěšně použita pro biologické zobrazení H_2O_2 u živé myši.⁴⁶

Zuo a spol.⁴⁷ v roce 2021 navrhli pro detekci H_2O_2 fluorescenční sondu **CMB** s využitím molekuly kumarinu jako fluoroforu a boronátu jako rozpoznávací skupiny pro H_2O_2 (Obr. 24). Sonda **CMB** zobrazovala selektivně exogenní i endogenní H_2O_2 , měla nízkou toxicitu, dobrou biokompabilitu a permeabilitu buněčnými membránami. Tato sonda se tedy stala slibným nástrojem pro sledování hladiny H_2O_2 v souvislosti s fyziologickým a patologickým výzkumem.



Obr. 24: Selektivní detekce H_2O_2 sondy **CMB** pomocí oxidace kyseliny fenyloboronové.⁴⁷

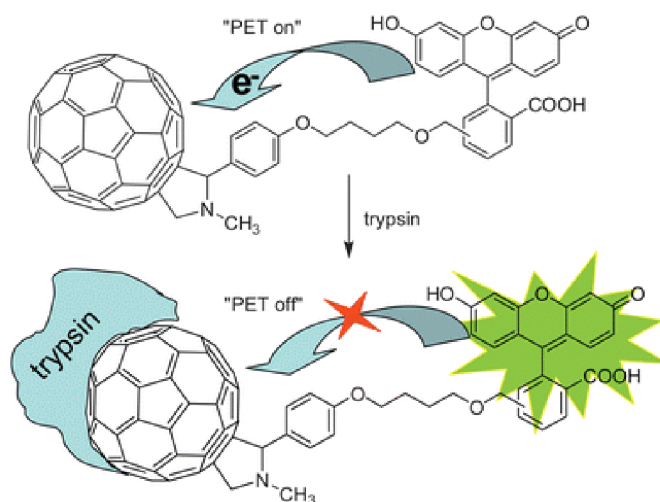
3.2 Fluorescenční sondy pro detekci trypsinu a chymotrypsinu

Trypsin (EC, 3.4.21.4.) je důležitý enzym trávicího systému vylučovaný slinivkou břišní jako neaktivní proenzym zvaný trypsinogen. V aktivní formě štěpí peptidovou vazbu proteinů, konkrétně na karboxy-terminální straně pozitivně nabitých aminokyselin, argininu a lysinu. Hydrolyzuje molekuly bílkovin na menší peptidy, aby se usnadnilo jejich vstřebávání ve střevě. Nekontrovaná sekrece enzymu však vede k vážným poruchám. Aktivita trypsinu je regulována pankreatickým sekrečním inhibítorem trypsinu (PSTI), který inhibuje sekreci trypsinu z pankreatických acinárních buněk, které by jinak poškodily pankreas, což by vedlo k pankreatitidě. Trypsin proto hraje klíčovou roli jako specifický biomarker pro diagnostiku důležitých biologických poruch, jako je pankreatitida, rakovina slinivky břišní, cystická fibróza a biliární cirhóza.⁴⁸

Chymotrypsin (EC 3.4.21.1), jedna z běžných serinových proteáz, hydrolyzuje peptidovou vazbu u karboxylového konce velkých hydrofobních aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Je přítomen v trávicím systému savců a účastní různých fyziologických procesů (např. trávení proteinů a rýžového škrobu, buněčná apoptóza).⁴⁹ K léčbě zánětu, otoku, při hojení ran nebo chirurgické infekce se chymotrypsin často používá jako aktivní složka ve farmaceutických přípravcích. Může sloužit i jako doplňková léčba u pneumonie, dermatitidy a oftalmologie. Jeho toxicita však nebyla důkladně prozkoumána.⁵⁰

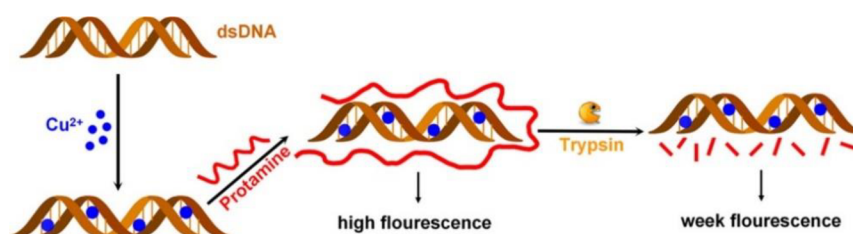
Ze všech těchto důvodů má velký význam vývoj jednoduchých, selektivních a citlivých metod pro detekci trypsinu a chymotrypsinu. Byla popsána řada metod pro jejich stanovení jako jsou například enzymatické imunosorbentní testy (ELISA)^{51,52}, elektrochemické metody^{53,54}, piezoelektrické metody⁵⁵ a další⁵⁶, avšak většina z nich je spojena s omezeními, které zahrnují například sofistikované přístrojové vybavení, nedostatek citlivosti, vysoké náklady nebo časovou náročnost. Proto byla pozornost soustředěna na levnější, citlivější, rychlejší a snadno proveditelné způsoby detekce. Jedním z možných řešení se staly fluorescenční sondy.⁴⁸ Dále proto uvádím několik příkladů fluorescenčních sond pro detekci trypsinu a chymotrypsinu publikovaných v posledních zhruba patnácti letech.

V roce 2011 Xu a spol.⁵⁷ navrhli a syntetizovali fluorescenční sondu **C60-FL** pro přímé stanovení trypsinu na základě fotoindukovaného přenosu elektronů (PET). Sonda se skládá ze dvou funkčních částí – fluoresceinu, který funguje jako fluorofor a donor elektronů, a fullerenu (C60), který působí jako akceptor elektronů a zároveň substrátový analog trypsinu. V přítomnosti trypsinu vykazovala sonda zvýšení fluorescence v důsledku inhibice přenosu elektronů v molekule sondy **C60-FL** (Obr. 25). Odezva sondy na trypsin byla přímá a rychlá a byla pozorována vysoká selektivita a dobrá citlivost (detekční limit 40 ng/ml).



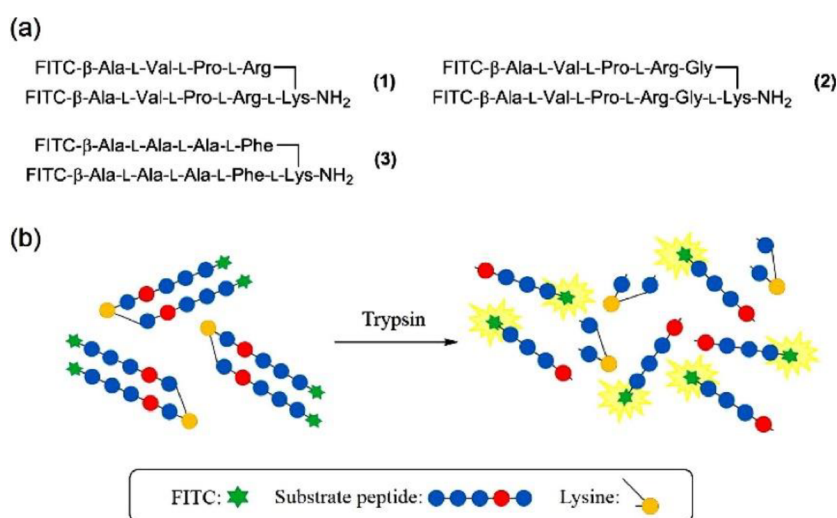
Obr. 25: Reakční mechanismus sondy **C60-FL** a trypsinu.⁵⁷ (Převzato se svolením nakladatelství Royal Chemical Society.)

V roce 2016 Wang a spol.⁵⁸ vyvinuli jednoduchou, ultracitlivou fluorescenční sondu **dsDNA-Cu NCs** bez fluorescenční značky pro trypsin a jeho inhibitory založenou na nanoklastrech složených z atomů mědi zavedených do molekuly DNA. Fluorescenční Cu nanoklastery (Cu NCs) byly vytvořeny použitím dvouřetězcové DNA (dsDNA) jako templátů. Intenzita fluorescence **dsDNA-Cu NCs** byla významně zvýšena, když byl k sondě přidán protamin sulfát, protože vytvářel komplexy s **dsDNA-Cu NCs** prostřednictvím interakce s templáty DNA (Obr. 26). Protamin byl navíc ideálním trypsinovým substrátem díky jeho struktuře bohaté na arginin. Takže přidání trypsinu vedlo k disociaci komplexu protamin/DNA díky jeho schopnosti hydrolýzy protaminu a intenzita fluorescence **dsDNA-Cu NCs** byla zhasena. Ve srovnání s jinými metodami tato sonda nepotřebovala složitý návrh sekvence DNA, fluorescenční značení barvivem a má mnohem nižší detekční limit (0,048 ng/ml).



Obr. 26: Schematické znázornění strategie pro detekci trypsinu na základě **dsDNA-Cu NC**.⁵⁸ (Převzato se svolením nakladatelství Elsevier.)

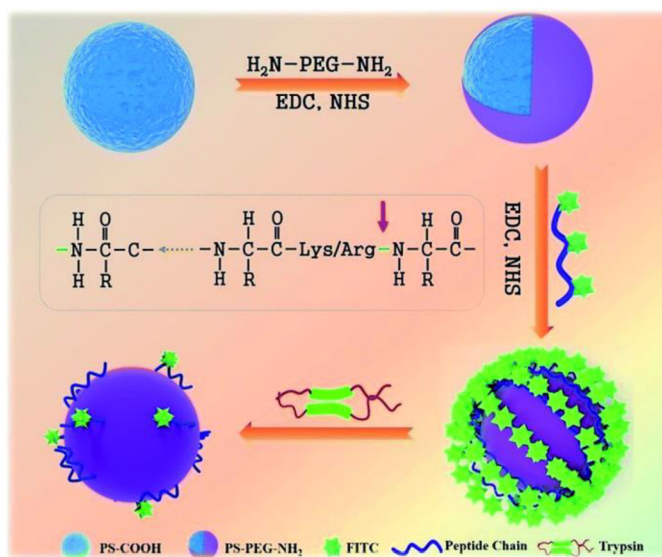
Téhož roku Sato a spol.⁷ připravili tři jednoduché a snadno syntetizovatelné sondy **XIV**, **XV** a **XVI** na principu samozhášení pro detekci aktivity trypsinu a chymotrypsinu (Obr. 27). Sondy se skládají ze dvou specifických peptidových řetězců jakožto místa účinku pro enzym, které jsou navzájem spojeny přes dvě aminoskupiny lysinu, a na koncích řetězců mají navázané molekuly fluoresceinu po reakci s fluorescein isothiokyanátem (FITC). Před proteolytickým štěpením není viditelná emise fluoresceinu díky intramolekulárnímu samozhášení. Po štěpení enzymem se jeho fluorescence obnoví. Testy ukázaly, že tyto sondy na principu samozhášení by mohly být použitelné i pro detekci aktivit dalších proteáz. Autoři zdůraznili, že tyto sondy s dobrou citlivostí lze jednoduše připravit pomocí standardní peptidové syntézy na pevné fázi.



Obr. 27: (a) Navržené struktury samozhášivých sond **XIV** (1), **XV** (2) pro trypsin a **XVI** (3) pro chymotrypsin. (b) Obecné schéma způsobu detekce sondy **XV**.⁷ (Převzato se svolením nakladatelství Elsevier.)

V roce 2019 Song a spol.⁵⁹ vyvinuli jednoduchou a účinnou strategii pro citlivou, kvalitativní a kvantitativní analýzu aktivity trypsinu pomocí fluorescenční polystyrenové (PS) mikrokuličkové sondy **PS-PEG-Pep**. Komerční mikrokuličky z PS byly modifikovány ochrannou vrstvou PEG, aby se zabránilo nespecifické fyzikální adsorpci molekul na povrch kuliček. Poté se modifikované kuličky PS-PEG spojily s peptidem s navázanou molekulou fluorescein isothiokyanátu jako fluorofor (peptid-FITC). Použitý peptid obsahoval velké množství aminokyselin lysinu a argininu, které fungovaly jako rozpoznávací místa pro trypsin. Když trypsin interagoval s mikrokuličkovou sondou **PS-PEG-Pep**, peptidové řetězce se štěpily a část peptid-FITC se v roztoku rychle rozložila na volné malé fragmenty, což mělo za následek postupný pokles fluorescence **PS-PEG-**

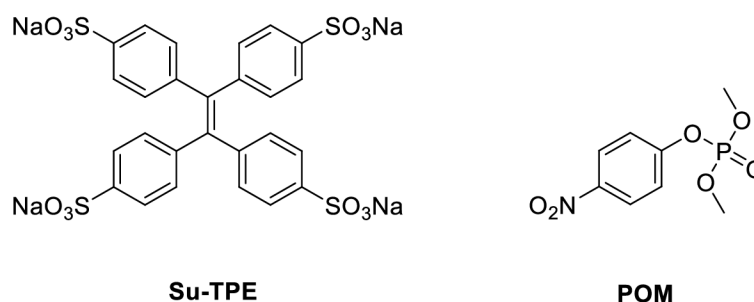
Pep (Obr. 28). Fluorescenční mikrokuličková sonda **PS-PEG-Pep** poskytla citlivou (detekční limit 0,5 ng/ml), rychlou a selektivní strategii pro detekci aktivního trypsinu.



Obr. 28: Schématické znázornění způsobu detekce trypsinu sondou **PS-PEG-Pep**.⁵⁹

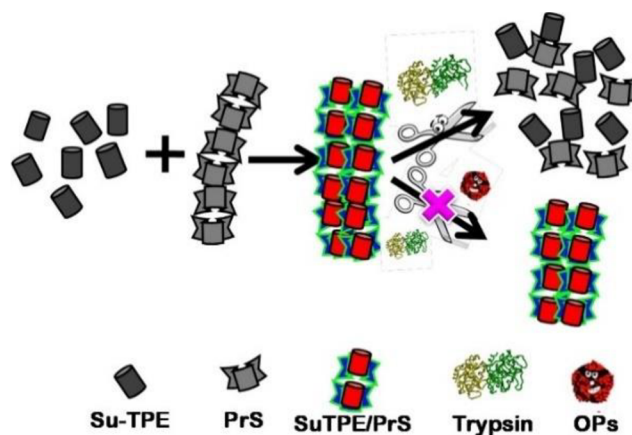
V roce 2021 Kaur a spol.⁴⁸ navrhli citlivý a rychlý biosenzor založený na agregaci indukované emise (AIE) pro detekci trypsinu a organofosfátových pesticidů. Fluorogeny způsobující AIE nevykazují žádnou nebo pouze velmi slabou emisi, pokud jsou v roztoku v izolovaném stavu, zatímco při agregaci zaznamenávají vynikající emisi. Mechanismus může spočívat ve faktu, že při agregaci molekul dochází k bránění intramolekulárních rotačních pohybů kolem původně flexibilních vazeb.

Biosenzor **Su-TPE/PrS** je založen na supramolekulárním komplexu vytvořeném mezi tetraaniontovým sulfonylovým derivátem tetrafenylethylenu (Su-TPE, Obr. 29) a polykationtovými protaminovými molekulami (PrS). Komplex **Su-TPE/PrS** drží pohromadě pomocí elektrostatických interakcí. Protamin, silně kladně nabitý protein bohatý na arginin, slouží jako přirozený substrát pro trypsin.⁴⁸



Obr. 29: Struktury jednotky Su-TPE a paraoxon methylu (POM).⁴⁸

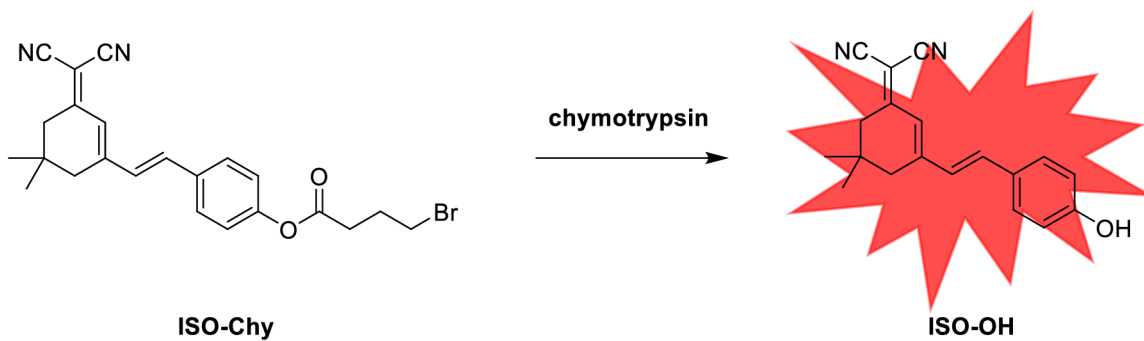
Molekuly Su-TPE zůstávají v izolovaném stavu nefluorescenční, zatímco v agregovaném stavu s molekulami PrS silně emitují. V přítomnosti trypsinu však enzymolýza PrS vede k rozpadu supramolekulárního komplexu **Su-TPE/PrS** a tím zhášení fluorescence, což poskytuje způsob detekce trypsinu (Obr. 30). Kromě toho současný systém také reaguje na přítomnost paraoxon methyly (POM, Obr. 29) jako modelového příkladu organofosfátových pesticidů. V přítomnosti POM je inhibována enzymatická aktivita trypsinu, a proto je obnovena fluorescence komplexu **Su-TPE/PrS**, což poskytuje způsob detekce organofosfátových pesticidů. Takto navržený systém poskytuje citlivou a selektivní strategii pro detekci trypsinu založenou na AIE, která může mít značnou perspektivu v biomedicínské a klinické oblasti pro monitorování trypsinu u poruch, jako je pankreatitida, cystická fibróza, atd. Aplikace tohoto senzorového systému může být také potenciálně rozšířena pro monitorování organofosfátových pesticidů ve vzorcích vody a potravin.⁴⁸



Obr. 30: Schématické znázornění principu detekce trypsinu sondou **Su-TPE/PrS**.⁴⁸

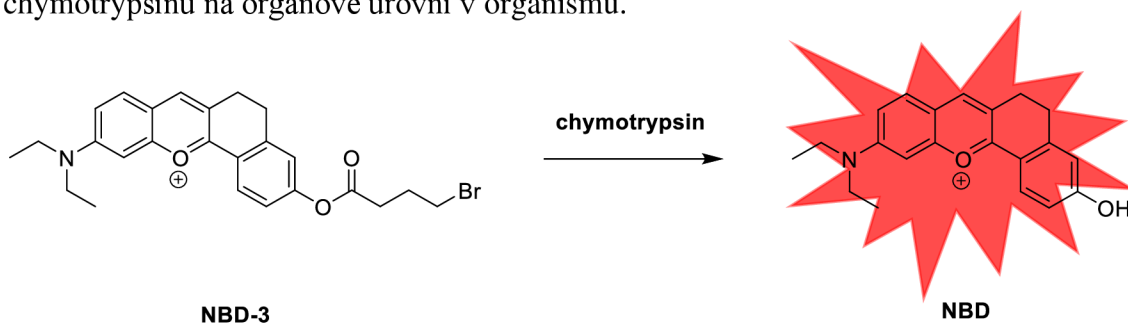
(Převzato se svolením nakladatelství Elsevier.)

Lan a spol.⁴⁹ v roce 2022 publikovali vývoj první NIR fluorescenční sondy **ISO-Chy** cílenou na endoplazmatické retikulum (ER) pro citlivou a selektivní detekci chymotrypsinu. Jako fluorofor použili dikyanoderivát izoforonu a jako rozpoznávací skupinu pro enzym zavedli do sondy 4-brombutyl. V přítomnosti chymotrypsinu se štěpila esterová vazba za uvolnění silně fluoreskující molekuly **ISO-OH** (Obr. 31). Sonda **ISO-Chy** byla úspěšně použita pro monitorování endogenní aktivity chymotrypsinu v živých buňkách a na myších modelech nesoucích nádor HepG2. Toto je první úspěšná studie, díky které se vizualizoval chymotrypsin v ER živých buněk a nádorové tkáni.



Obr. 31: Mechanismus detekce chymotrypsinu sondou **ISO-Chy**.⁴⁹

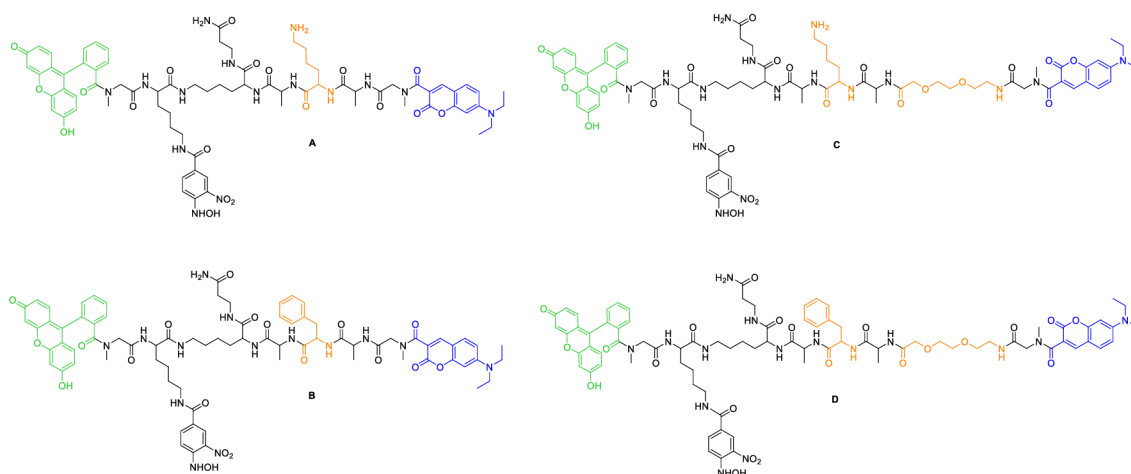
Tento rok Qu a spol.⁵⁰ publikovali fluorescenční sondu **NBD-3** pro detekci endogenního chymotrypsinu. Jasně červený fluorofor NBD maskovaly esterifikací hydroxyskupiny 4-brombutyrylchloridem. V přítomnosti chymotrypsinu je esterová vazba štěpena a fluorescenční signál obnoven (Obr. 32). Tuto sondu použili pro *in vivo* zobrazování u myši a pro detekci endogenního chymotrypsinu v buňkách HeLa. Pomocí zobrazování orgánů *in vitro* byli schopni poprvé pozorovat významné množství chymotrypsinu v myších játrech. Toto zjištění naznačuje, že sondu **NBD-3** lze použít ke studiu distribuce chymotrypsinu na orgánové úrovni v organismu.



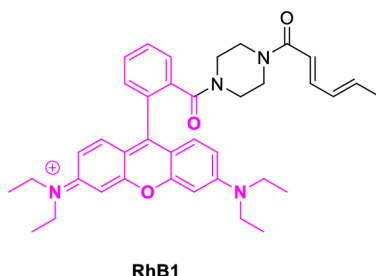
Obr. 32: Mechanismus detekce chymotrypsinu sondou **NBD-3**.⁵⁰

Výsledky a diskuze

Jak již bylo dříve uvedeno, cílem bakalářské práce je syntetizovat multifunkční fluorescenční sondy pro detekci peroxidu vodíku a proteáz trypsinu a chymotrypsinu. Navržené sondy jsou složeny ze dvou částí. Pro první část sondy byly navrženy čtyři cílové modifikace **A**, **B**, **C** a **D** (Obr. 33). Strukturální odlišnosti (vyznačeny oranžově) spočívají v záměně aminokyselin lysin a fenylalanin v pravé části kostry, dále modifikace **C** a **D** obsahují navíc molekulu PEG. Všechny modifikace nesou fluorescenční barviva fluorescein (vyznačený zeleně) a kumarin D (vyznačený modře), a dále pak fenyl substituovaný hydroxylaminovou skupinou.



Obr. 33: Navržené cílové modifikace první části sondy **A**, **B**, **C** a **D**.



RhB1

Obr. 34: Druhá část sondy **RhB1**.

Druhá část sondy molekula **RhB1** má pouze jednu navrženou strukturu (Obr. 34). Obsahuje fluorescenční barvivo rhodamin B (vyznačeno růžově), na které je přes

amidovou vazbu navázaný piperazin. Na druhý dusík piperazinu je opět přes amidovou vazbu napojená kyselina sorbová. Návrh syntetické cesty a přípravu molekuly **RhB1** provedl konzultant MSc. David Miličević, Ph.D, a proto zde nebudou rozebírány.

Nejdříve bude diskutována syntéza první části sond **A-D**, následně měření fluorescenčních vlastností, a nakonec odezva vybrané modifikace sondy na přítomnost dané proteázy a peroxidu vodíku.

4. Příprava sond

4.1 První část syntézy

Pro přípravu cílových sond **A-D** byla zvolena standardní peptidová syntéza na pevné fázi s použitím Rinkovy pryskyřice. První část syntézy zahrnující přípravu pokročilých intermediátů **4A-D** je nastíněna ve Schématu 2 a Tab. 2. Rinkovu pryskyřici bylo potřeba nejprve nechat reagovat s roztokem piperidinu v DMF (1:1, V/V), aby se odštěpila chránící skupina Fmoc z její aminoskupiny. Odchráněná pryskyřice se nechala reagovat s 0,3M roztokem Fmoc- β -alaninu, HOBt a DIC v DCM/DMF (1:1, V/V) přibližně 1 hodinu při pokojové teplotě za vzniku meziprojektu **2**. Použití sloučenin HOBt a DIC pro imobilizaci aminokyselin na pryskyřici je běžně využívanou technikou při SPPS („solid-phase peptide synthesis“). DIC slouží k aktivaci karboxylové skupiny aminokyseliny, kterou chceme vázat k pryskyřici, a HOBt se používá k zabránění racemizace, aby se zachovala konfigurace opticky čistých L-aminokyselin. V dalších krocích syntézy se vždy nejprve zopakovalo odstranění Fmoc skupiny a poté navázání další nové aminokyseliny.

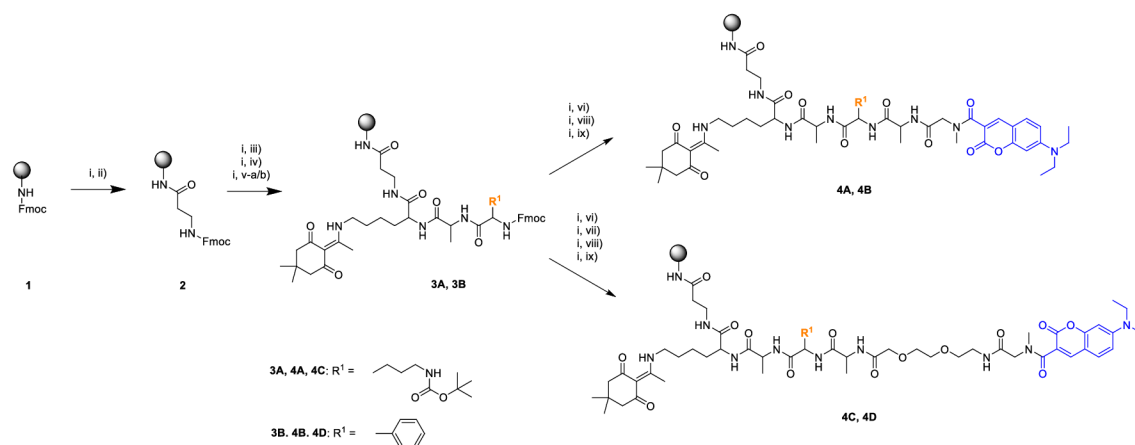


Schéma 2: Příprava prekurzorů pro první části sond.

Tab. 2: Reakční podmínky pro první část syntézy sond.

	Reakční podmínky		Teplota	Čas
i)	Piperidin/DMF (1:1, V/V)		rt	15 min
ii)	Fmoc- β -Ala-OH (0,3M) HOBt (0,3M), DIC (0,3M), DCM/DMF (1:1, V/V)		rt	1 hod
iii)	Fmoc-Lys(Dde)-OH (0,3M) HOBt (0,3M), DIC (0,3M), DCM/DMF (1:1, V/V)		rt	1 hod
iv)	Fmoc-Ala-OH (0,3M) HOBt (0,3M), DIC (0,3M), DCM/DMF (1:1, V/V)		rt	1 hod
v-a)	Fmoc-Lys(Boc)-OH (0,3M)	HOBt (0,3M), DIC (0,3M), DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	1 hod
v-b)	Fmoc-Phe-OH (0,3M)			
vi)	Fmoc-Ala-OH (0,2M) HOBt (0,2M), DIC (0,2M), DCM/DMF (1:1, V/V)		rt	1 hod
vii)	Fmoc-NH-PEG-COOH (0,2M) HOBt (0,2M), DIC (0,2M), DCM/DMF (1:1, V/V)		rt	1 hod
viii)	Fmoc-Sar-OH (0,2M) HOBt (0,2M), DIC (0,2M), DCM/DMF (1:1, V/V)		rt	1 hod
ix)	DEAC (0,2M) HOBt (0,2M), DIC (0,2M), DMAP (0,2M) DMSO/DCM/DMF (2:2:1, V/V/V)		rt	16 hod

V reakčním kroku v) došlo k diverzifikaci syntetického přístupu směrem k sondám **A** a **B**. Navázáním Fmoc-Lys(Boc)-OH vznikl intermediát pro přípravu sondy **A**, navázáním Fmoc-Phe-OH pak pro přípravu sondy **B**. Od reakčního kroku vi) se snížila koncentrace reakční směsi aminokyseliny, HOBt a DIC z $0,3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ na $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Nižší koncentrace se ukázala jako dostačující. Dosáhlo se tak menšího zatížení pryskyřice, tudíž ji nebylo potřeba tolik promývat. Tímto krokem jsme ušetřili spotřebu rozpouštědel i reakčních komponent jako jsou aminokyseliny, HOBt, DIC a DMAP.

Modifikace sond **C** a **D** se připravily reakcí s Fmoc chráněnou 2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)octovou kyselinou (PEG) v reakčním kroku vii). Molekula PEG byla do struktury zařazena z důvodu zvýšení rozpustnosti.

Následným navázáním molekuly sarkosinu a kumarinu byla dokončena syntéza prekurzorů **4A-D**.

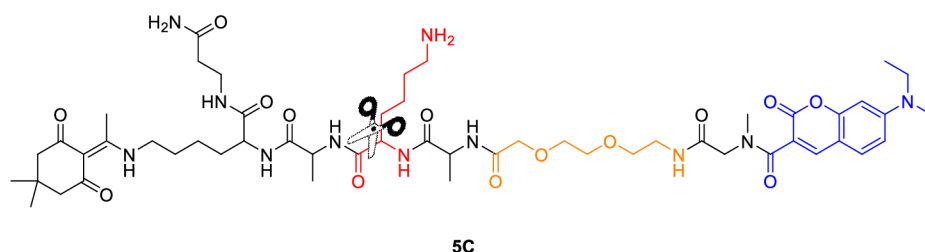
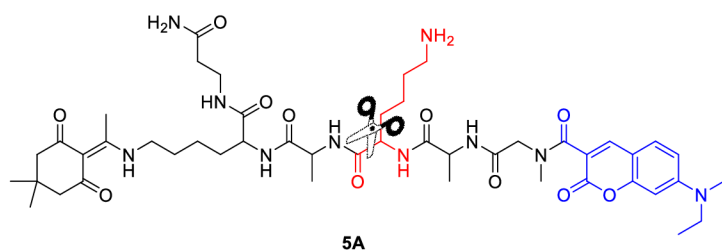
4.2 Zkušební štěpení intermediátů proteázami

Připravené intermediáty **4A-D** byly již v této fázi syntézy podrobeny testovacímu štípání odpovídajícími enzymy. Chtěli jsme si ověřit, zda vůbec dochází ke štěpení peptidového řetězce u těchto prekurzorů, protože pokud by k němu nedocházelo, nemělo by význam pokračovat v přípravě navržených cílových molekul a bylo by potřeba navrhnout zcela novou strukturu první části sond.

Všechny intermediáty byly odštěpeny z pryskyřice pomocí štěpícího koktejlu 50% TFA/DCM a suché produkty **5A-D** byly podrobeny zkouškám rozpustnosti. V čistém TRIS pufru nebyl ani jeden intermediát zcela rozpustný, naopak v čistém DMSO vykazovaly všechny vzorky dobrou rozpustnost. Proto byly vzorky nejdříve rozpuštěny v co nejmenším potřebném množství DMSO, a až poté zředěny TRIS puftrem na požadovanou koncentraci. Pro enzymatické testování se využilo pouze měření na LC/MS.

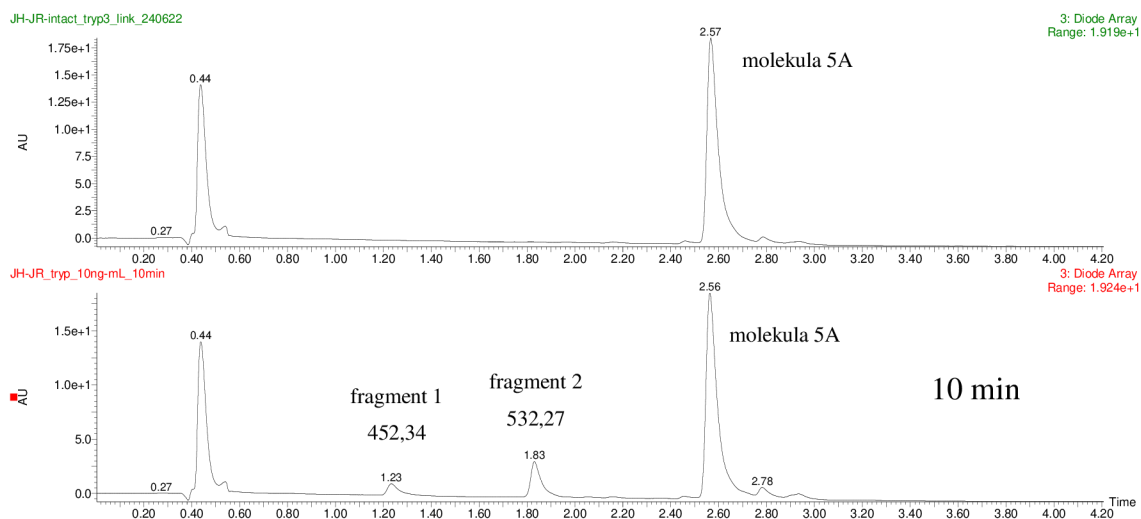
4.2.1 Štěpení trypsinem

Enzym trypsin štípá peptidový řetězec u karboxylového konce aminokyselin lysinu a argininu, a proto pro tento enzym byly navrženy molekuly **5A** a **5C** obsahující lysin (Obr. 35). Pro experimenty se využil objem trypsinu 10 μ l a měřila se dvojí koncentrace 10 a 100 ng v 1 ml.

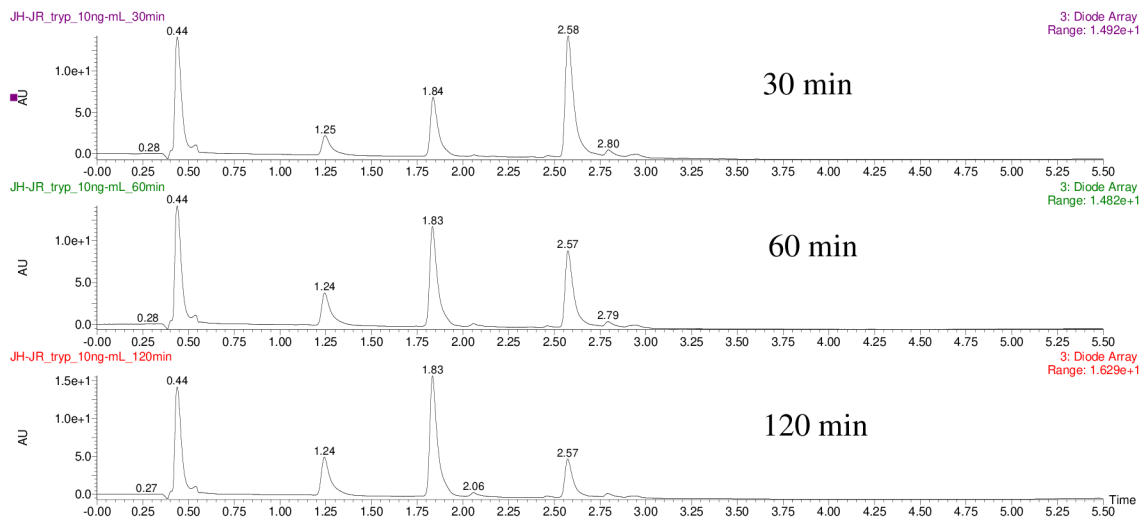


Obr. 35: Znázornění štěpného místa pro trypsin na intermediátech **5A** a **5C**.

Molekula **5A** o koncentraci 100 μM se měřila v roztoku 0,55% DMSO v TRIS pufru. Nejdříve se měřil slepý vzorek s přidavkem 10 μl čisté 1 mM HCl. Pík s retenčním časem 2,57 minut odpovídá molekule **5A**. Následovalo enzymatické měření s trypsinem o koncentraci 10 ng v 1 ml v určitých časových intervalech. Jak je z chromatogramu zjevné (Obr. 36), už po 10 minutách jsou patrné píky 1,23 a 1,83 minut odpovídající rozštěpeným fragmentům molekuly **5A**. Následně se měřilo po 30, 60 a 120 minutách a na analýzách můžeme pozorovat postupné štěpení molekuly **5A** (Obr. 37).

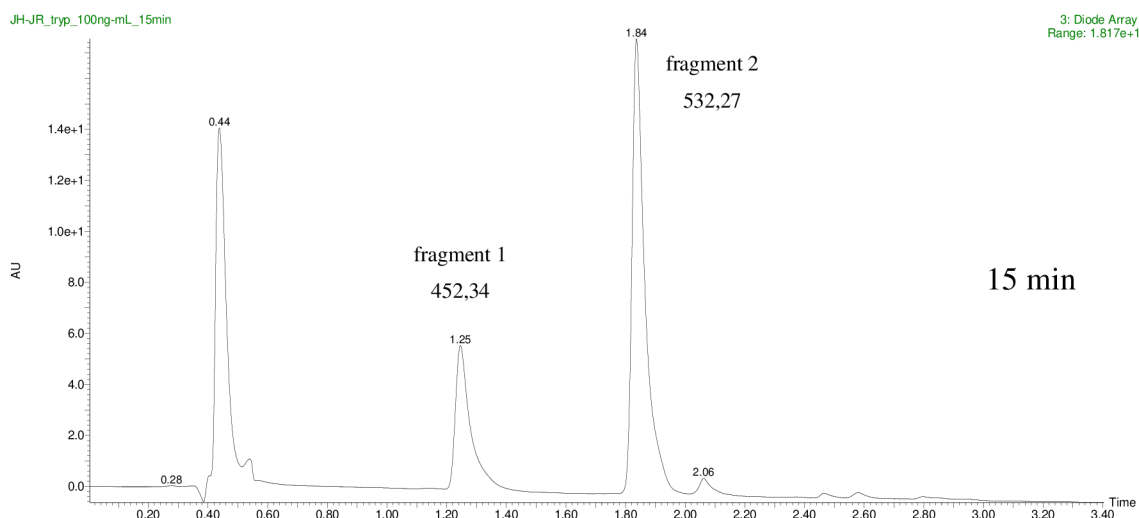


Obr. 36: Analýza LC/MS slepého vzorku molekuly **5A** a štěpení trypsinem (10 ng/1 ml) po 10 minutách.



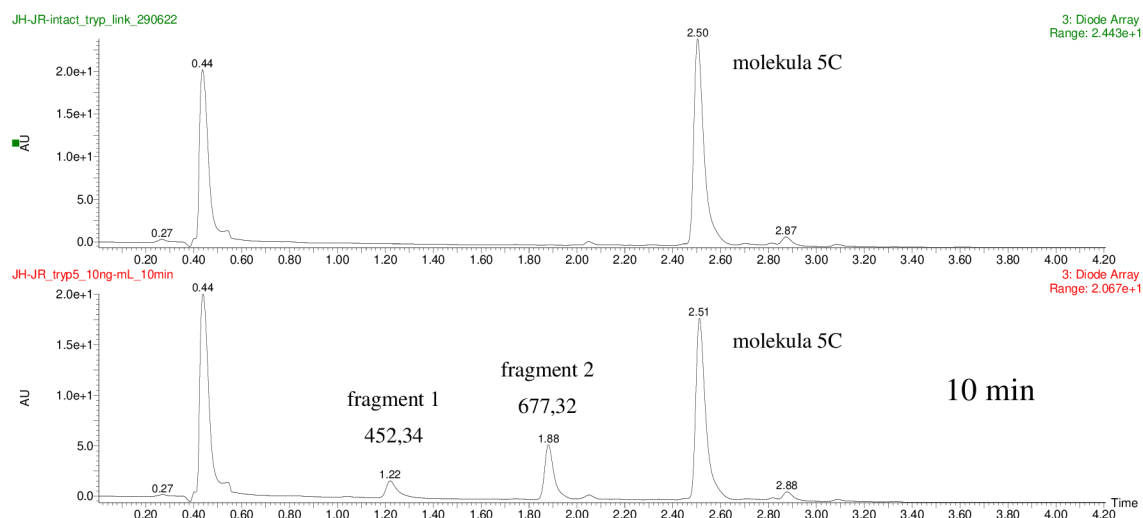
Obr. 37: Štěpení molekuly **5A** trypsinem (10 ng/1 ml) po 30, 60 a 120 minutách.

Pokud byla použita koncentrace trypsinu 100 ng v 1 ml, tak už po 15 minutách byla molekula **5A** zcela rozštěpena a na chromatogramu jsme pozorovali pouze píky odpovídající fragmentům molekuly v 1,25 a 1,84 minutách (Obr. 38).



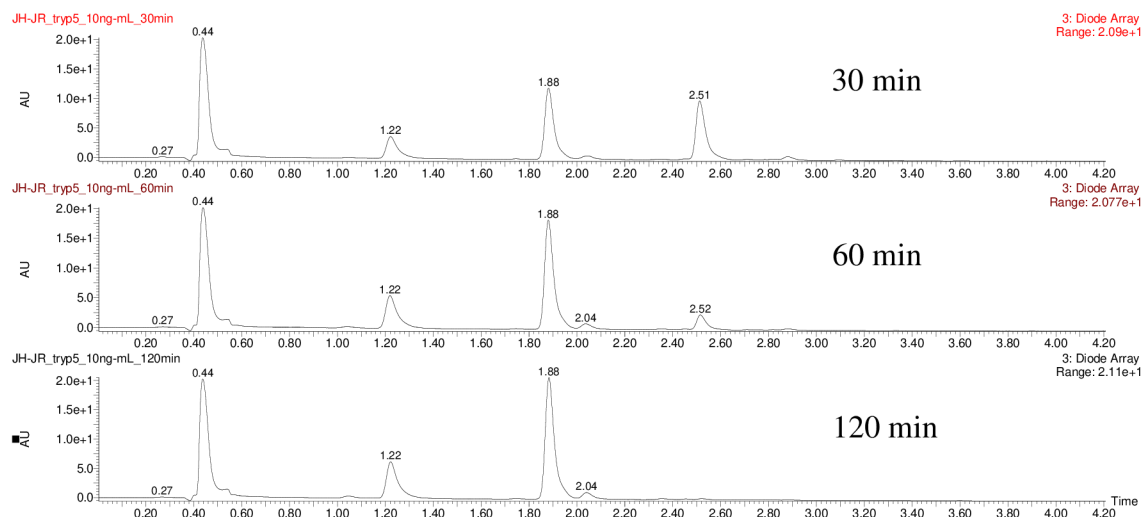
Obr. 38: Štěpení molekuly **5A** trypsinem (100 ng/1 ml) po 15 minutách.

Molekula **5C** opět o koncentraci 100 μ M se měřila v roztoku 1% DMSO v TRIS puftru. Opět se nejdříve změřil slepý vzorek a poté se měřilo s přidavkem trypsinu o koncentraci 10 ng v 1 ml v určitých časových intervalech. Už po 10 minutách štěpení jsou viditelné píky 1,22 a 1,88 minut odpovídající rozštěpeným fragmentům a pík 2,51 minut patří molekule **5C** (Obr. 39).

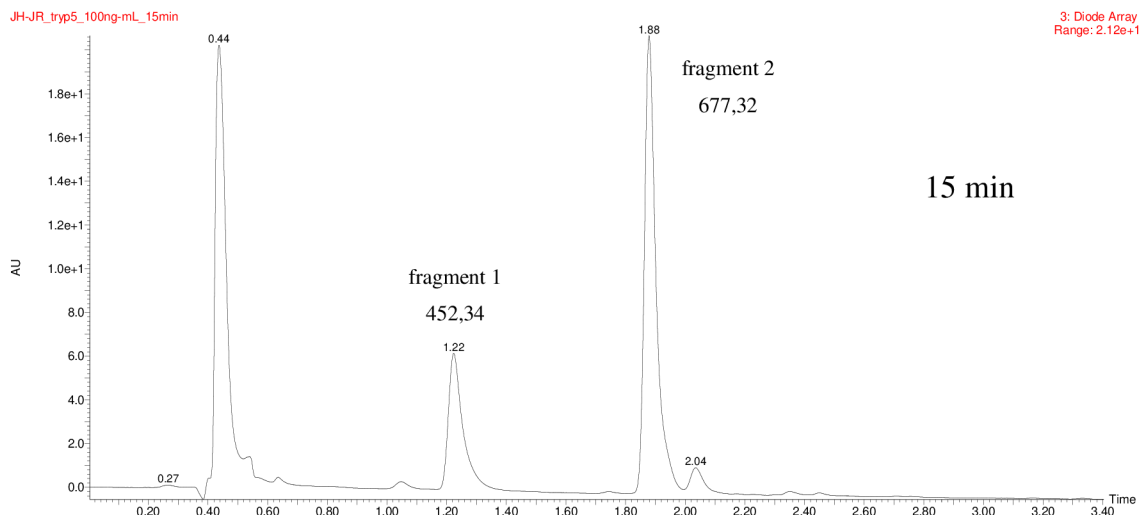


Obr. 39: Analýza LC/MS slepého vzorku molekuly **5C** a štěpení trypsinem (10 ng/1 ml) po 10 minutách.

V měření štěpné reakce se dále pokračovalo v časových intervalech 30, 60 a 120 minut (Obr. 40). Molekula **5C** byla po 120 minutách kompletně rozštěpena na rozdíl od molekuly **5A**, tudíž pro trypsin je lepším substrátem molekula **5C**. Byla změřena i koncentrace trypsinu 100 ng v 1 ml, kdy opět již po 15 minutách byla molekula **5C** zcela rozštěpena (Obr. 41).



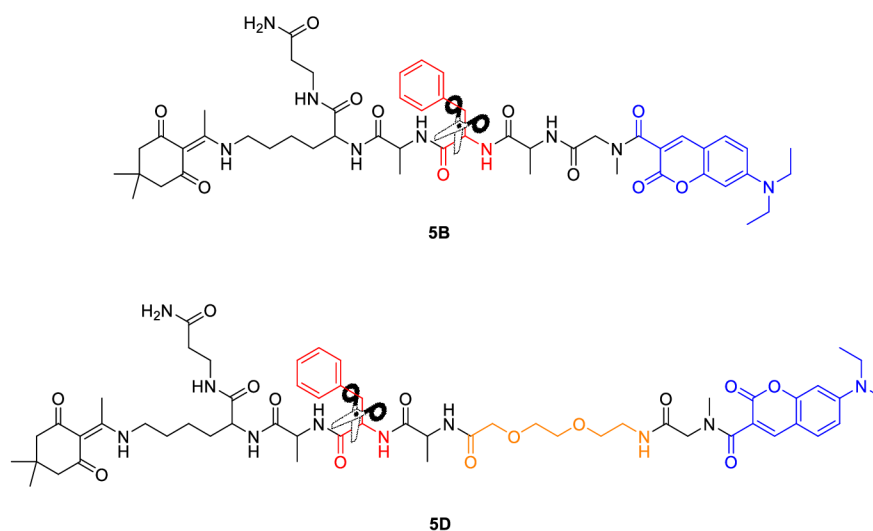
Obr. 40: Štěpení molekuly **5C** trypsinem (10 ng/1 ml) po 30, 60 a 120 minutách.



Obr. 41: Štěpení molekuly **5C** trypsinem (100 ng/1 ml) po 15 minutách.

4.2.2 Štěpení chymotrypsinem

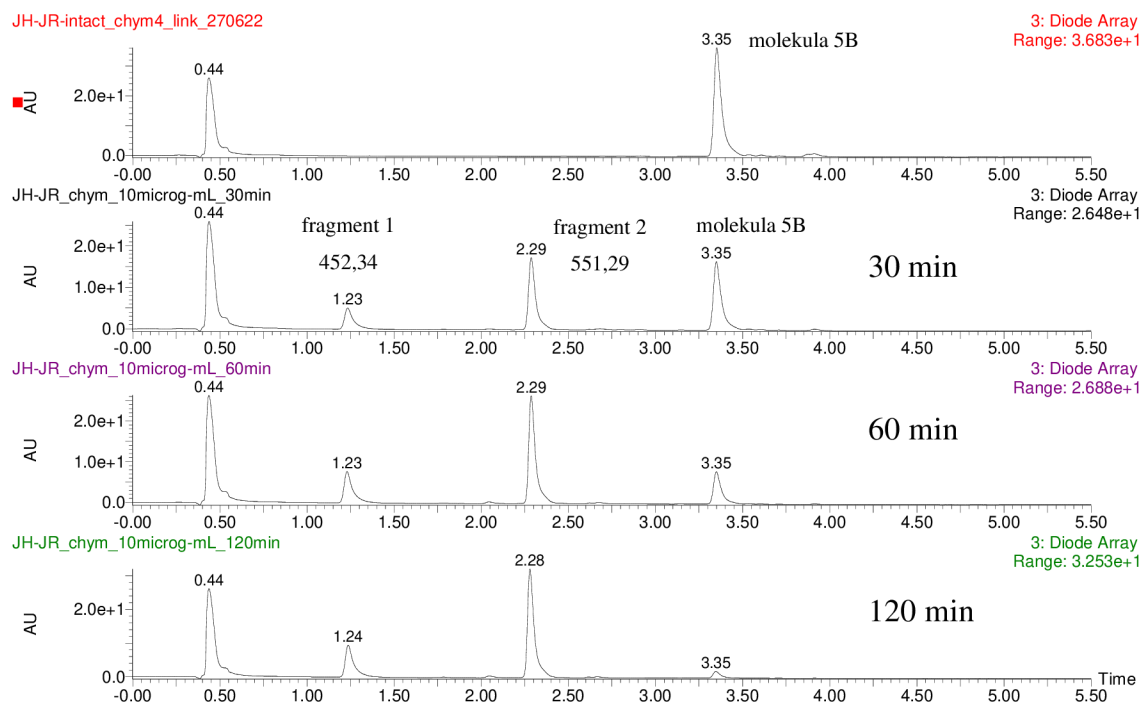
Enzym chymotrypsin štípá peptidový řetězec u karboxylového konce velkých hydrofobních aminokyselin fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu, a proto pro tento enzym byly navrženy molekuly **5B** a **5D** obsahující fenylalanin (Obr. 42). Pro experimenty se využil objem chymotrypsinu 10 μ l, který se měřil v koncentracích 10 a 50 μ g v 1 ml.



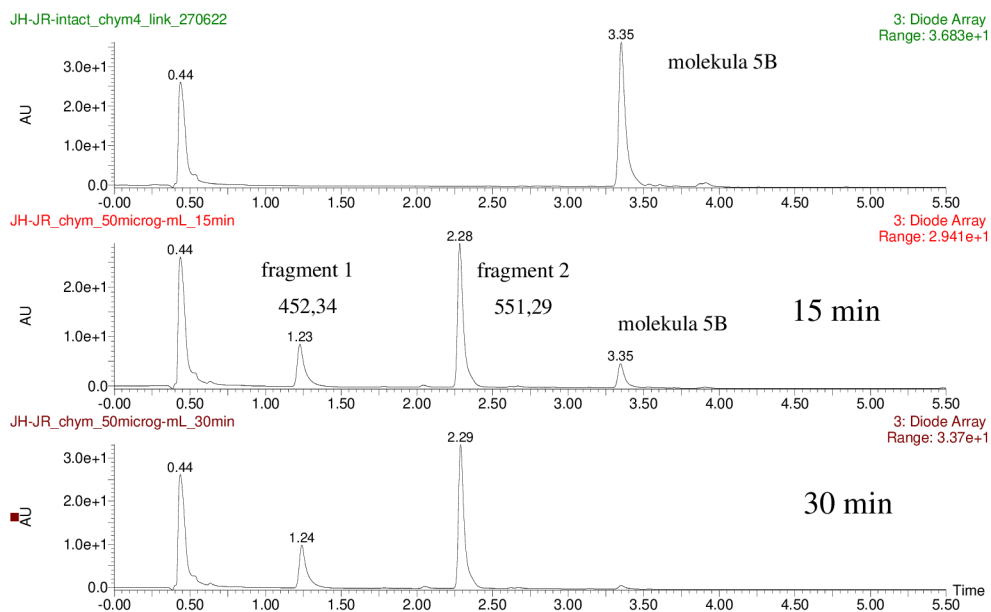
Obr. 42: Znázornění štěpného místa pro chymotrypsin na intermediátech **5B** a **5D**.

Molekula **5B** o koncentraci 100 μ M se měřila v roztoku 2% DMSO v TRIS pufru. Postupovalo se obdobně jako v předchozích měřeních, nejdříve se zanalyzoval slepý vzorek jen s 1 mM HCl, a poté se měřilo s 10 μ g chymotrypsinu v časových intervalech 15, 30, 60 a 120 minut (Obr. 43). Po 15 minutách lze na analýze vidět píky 1,23 a

2,29 minut odpovídající rozštěpeným fragmentům a pík 3,35 minut patří molekule **5B**. Po 120 minutách štěpení je téměř vše rozštěpeno. Při zvýšení koncentrace chymotrypsinu na 50 μg v 1 ml se štěpení urychlilo (Obr. 44). Po 30 minutách byla téměř všechna molekula **5B** rozštěpena.

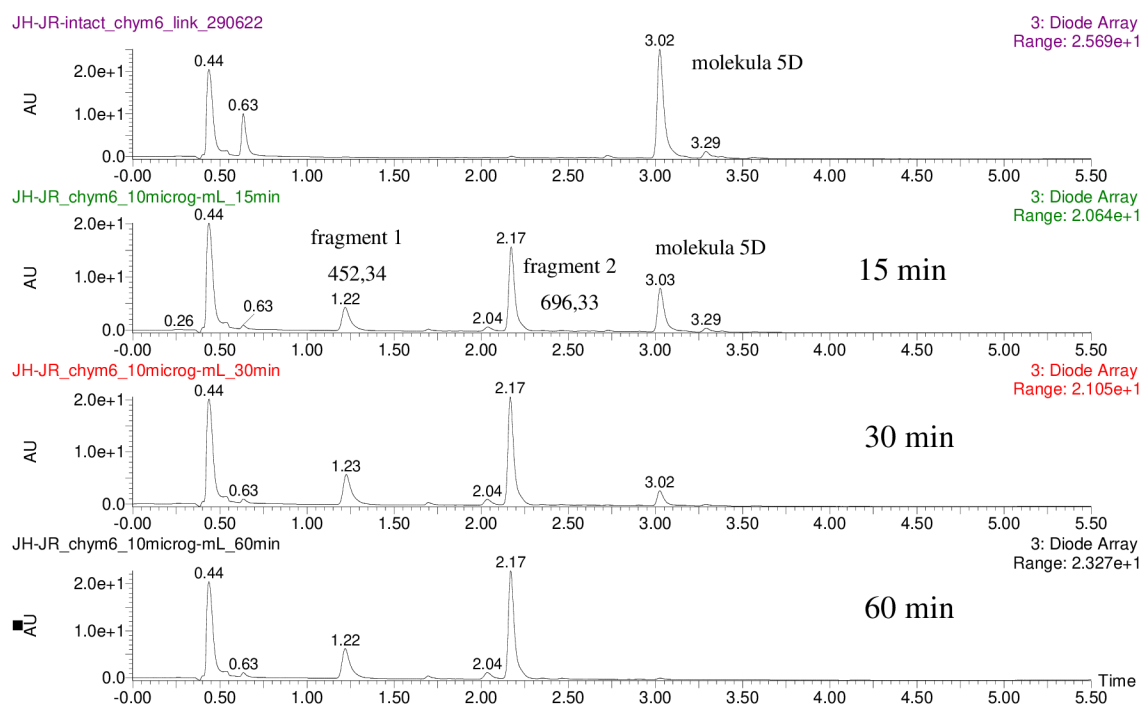


Obr. 43: Analýza LC/MS slepého vzorku molekuly **5B** a štěpení chymotrypsinem (10 μg /1 ml) po 30, 60 a 120 minutách.

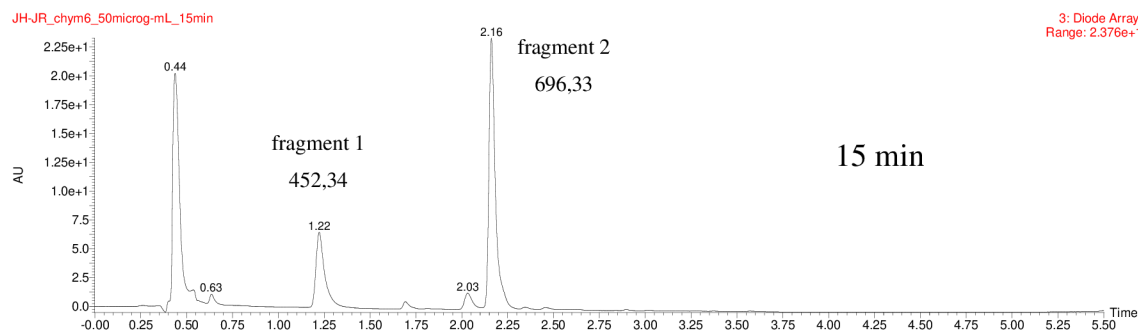


Obr. 44: Štěpení molekuly **5B** chymotrypsinem (50 μg /1 ml) po 15 a 30 minutách.

Intermediát **5D** o koncentraci 100 μM se měřil v roztoku 1% DMSO v TRIS pufru. Byl změřen slepý vzorek a poté vzorek s chymotrypsinem o koncentraci 10 μg v časových intervalech 15, 30 a 60 minut (Obr. 45). Jak je patrné z analýzy, po 60 minutách byla téměř všechna molekula **5D** s retenčním časem 3,02 minut rozštěpena enzymem na fragmenty v retenčních časech 1,22 a 2,17 minut. Při zvýšení koncentrace chymotrypsinu na 50 μg v 1 ml bylo již po 15 minutách všechno množství molekuly rozštěpeno (Obr. 46).



Obr. 45: Analýza LC/MS slepého vzorku molekuly **5D** a štěpení chymotrypsinem (10 $\mu\text{g}/1$ ml) po 15, 30 a 60 minutách.



Obr. 46: Štěpení molekuly **5D** chymotrypsinem (50 $\mu\text{g}/1$ ml) po 15 minutách.

Z těchto měření vyplývá, že pro chymotrypsin je lepším substrátem intermediát **5D**, protože v obojím měření s různými koncentracemi enzymu došlo k rychlejšímu štípání.

4.3 Druhá část syntézy

Druhá část syntézy zahrnující přeměnu intermediátů **4A-D** na cílové molekuly **A-D** (viz. Obr. 33) se jevila jako obtížná vzhledem k velikosti a struktuře molekul. Předpokládali jsme větší ztrátu materiálu při optimalizacích, a proto jsme se z preventivních důvodů rozhodli pracovat pouze s intermediáty sond **4B** a **4C**.

4.3.1 Postup A

Tento postup je naznačen ve Schématu 3. Nejprve bylo potřeba ochránit Dde skupinu navázanou na koncové aminoskupině lysinu. Byla vyzkoušena deprotektce s využitím hydroxylaminu a imidazolu za různých koncentrací a reakčních podmínek. V Tab. 3 jsou uvedeny reakční podmínky včetně čistoty ochráněných meziproduktů. První způsob s reakční dobou 1,5 hodiny se ukázal jako nevyhovující, protože nedošlo k úplnému odstranění Dde z aminoskupiny. Na základě zkušeností kolegů z výzkumné skupiny jsme snížili koncentraci reakčního roztoku, ale prodloužili dobu reakce nejdříve na 2 a poté na 3 hodiny. Reakční podmínky s nižší koncentrací roztoku a s reakčním časem 3 hodiny se ukázaly jako nejlepší, a proto byl tento způsob většinu syntézy používán.

Tab. 3: Vyzkoušené způsoby ochránění Dde z koncové aminoskupiny lysinu.

Reakční podmínky	Koncentrace [mol·dm ⁻³]	Rozpouštědlo	Čas	Čistota
NH ₂ OH.HCl imidazol	1,499 1,126	NMP/DCM (5:1, V/V)	1,5 hod	80 %
NH ₂ OH.HCl imidazol	0,907 0,632	NMP/DCM (3:2, V/V)	2 hod	81 %
NH ₂ OH.HCl imidazol	0,907 0,632	NMP/DCM (3:2, V/V)	3 hod	87 %

Pozn. U všech reakčních podmínek bylo provedeno pouze jedno měření.

V navrženém Postupu A, které popisuje Schéma 3 a Tab. 4 se po ochránění skupiny Dde postupovalo acylační reakcí s Fmoc-Lys(Dde)-OH, ochránění Fmoc klasickým způsobem pomocí piperidinu v DMF (1:1, V/V), navázáním Fmoc-NH-PEG-COOH, poté Fmoc-Sar-OH a nakonec reakcí s fluoresceinem za vzniku prekurzorů **6B** a **6C**. Z

důvodu špatné rozpustnosti prekursoru **4B** (viz. kap. 5.2) jsme se rozhodli i do této struktury zařadit molekulu PEG.

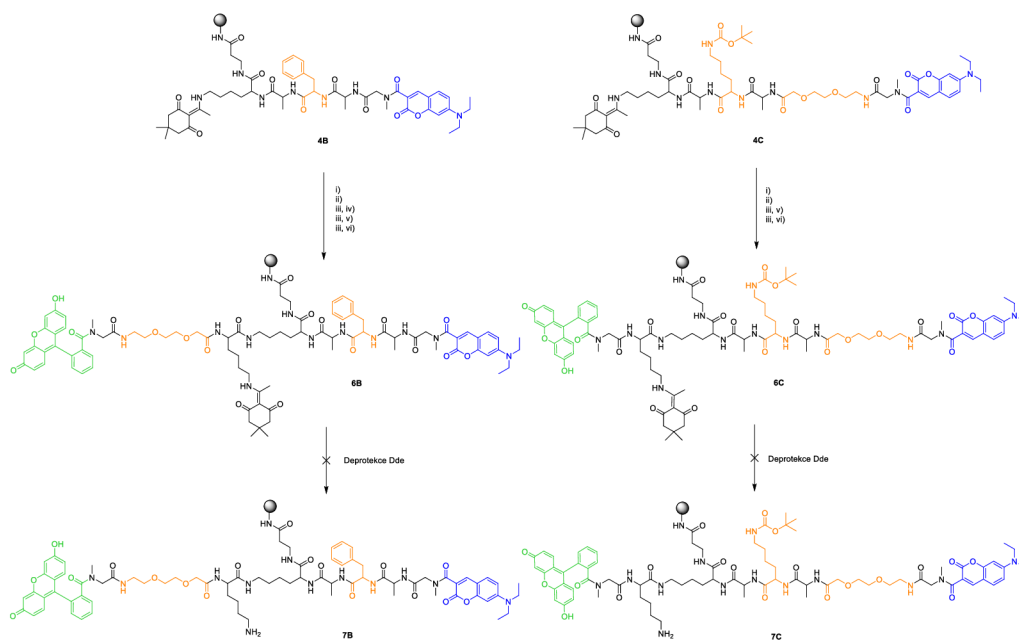


Schéma 3: Průběh syntézy Postupu A.

Tab. 4: Reakční podmínky syntézy podle Postupu A.

	Reakční podmínky	Teplota	Čas
i)	0,907M NH ₂ OH.HCl, 0,632M imidazol NMP/DCM (3:2, V/V)	rt	3 hod
ii)	Fmoc-Lys(Dde)-OH HOBt, DIC, DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	2 hod
iii)	Piperidin/DMF (1:1, V/V)	rt	15 min
iv)	Fmoc-NH-PEG-COOH HOBt, DIC, DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	2 hod
v)	Fmoc-Sar-OH HOBt, DIC, DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	2 hod
vi)	fluorescein HOBt, DIC, DMAP DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	16 hod

Pozn. U všech acylačních reakcí se pracovalo s koncentracemi roztoků aminokyseliny, fluoresceinu, HOBt, DIC a DMAP 0,2 mol · dm⁻³.

Vážnou komplikací se ukázalo odchránění druhé Dde skupiny na koncové aminoskupině lysinu u látek **6B** a **6C**. Byly odzkoušeny zmíněné způsoby deprotekce uvedené výše v Tab. 3 a ve všech případech docházelo podle LC/MS analýz ke značnému odštěpení fluoresceinu z peptidového řetězce. Z tohoto důvodu došlo ke změně strategie syntézy, která je popsána jako Postup B.

4.3.2 Postup B

Z důvodu nedostatku intermediátu **4B** byla optimalizace dalšího postupu studována pouze pro intermediát **4C**. Nová strategie zaměnila pořadí navazování komponent (Schéma 4). Po odstranění Dde chránící skupiny se navázal opět Fmoc-Lys(Dde)-OH a po odstranění Fmoc protektivní skupiny se místo Fmoc-Sar-OH navázala 4-fluoro-3-nitrobenzoová kyselina za vzniku sloučeniny **8C**. Reakční podmínky jsou přehledně uvedené v Tab. 5.

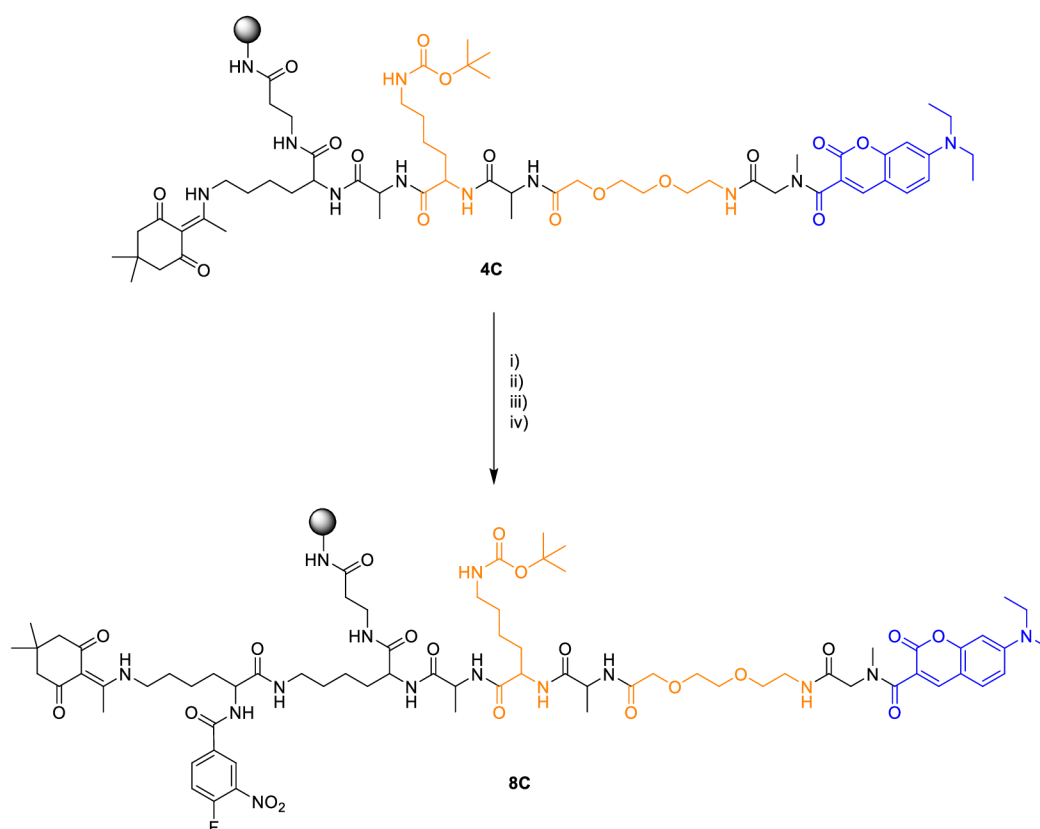


Schéma 4: Průběh syntézy podle Postupu B.

Tab. 5: Reakční podmínky syntézy podle Postupu B.

	Reakční podmínky	Teplota	Čas
i)	0,907M NH ₂ OH.HCl, 0,632M imidazol NMP/DCM (3:2, V/V)	rt	3 hod
ii)	Fmoc-Lys(Dde)-OH HOBt, DIC, DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	1 hod
iii)	Piperidin/DMF (1:1, V/V)	rt	15 min
iv)	4-fluoro-3-nitrobenzoová kyselina HOBt, DIC, DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	7 hod

Pozn. U všech acylačních reakcí se pracovalo s koncentracemi roztoků kyseliny, HOBt a DIC 0,2 mol·dm⁻³.

V dalším kroku následovala substituce fluoru na benzenovém jádře za hydroxylaminovou skupinu za vzniku sloučeniny **9C** (Schéma 5, Tab. 6). Pryskeřice se nechala reagovat s 1M roztokem hydroxylaminu v pyridinu přes noc při pokojové teplotě. Předpokládalo se, že za těchto reakčních podmínek dojde i k odstranění ochranné Dde skupiny. Tento předpoklad byl potvrzen a skutečně došlo i k deprotekcí koncové aminoskupiny lysinu. Jak jsme zjistili, bylo nutné po tomto kroku pryskeřici obzvlášť důkladně promýt, aby se zabránilo nechtěné redukci hydroxylaminu na aminoskupinu. Opět bylo odzkoušeno více způsobů, osvědčila se následující sekvence: 10 × pyridin, 10 × 1% AcOH/DMF, 10 × 20% H₂O/DMF, 10 × DMF, 10 × DCM, 3 × MeOH a pryskeřici zcela vysušit proudem dusíku.

Dále následovala acylační reakce intermediátu **9C** s Fmoc-Sar-OH s metodikou HOBt a DIC při pokojové teplotě 2 hodiny. Podle předpokladu se aminokyselina navázala tvorbou amidické vazby na ochráněnou aminoskupinu, nicméně došlo i k vytvoření esterové vazby s hydroxylaminovou skupinou za vzniku sloučeniny **10C** (Schéma 5). Pokračovalo se deprotekcí Fmoc ochráněné aminoskupiny, kdy došlo nejen k ochránění aminoskupiny, ale i zániku esterové vazby a obnovení hydroxylaminu za vzniku sloučeniny **11C**. V posledním kroku Postupu B, kdy se navazoval fluorescein, bylo zjištěno, že v přítomnosti hydroxylaminové skupiny se fluorescein na sarkosin neváže, a navíc dochází k redukci hydroxylaminu na amin za vzniku derivátu **12C**. Proto bylo přistoupeno opět ke změně strategie syntézy první části sondy **C**.

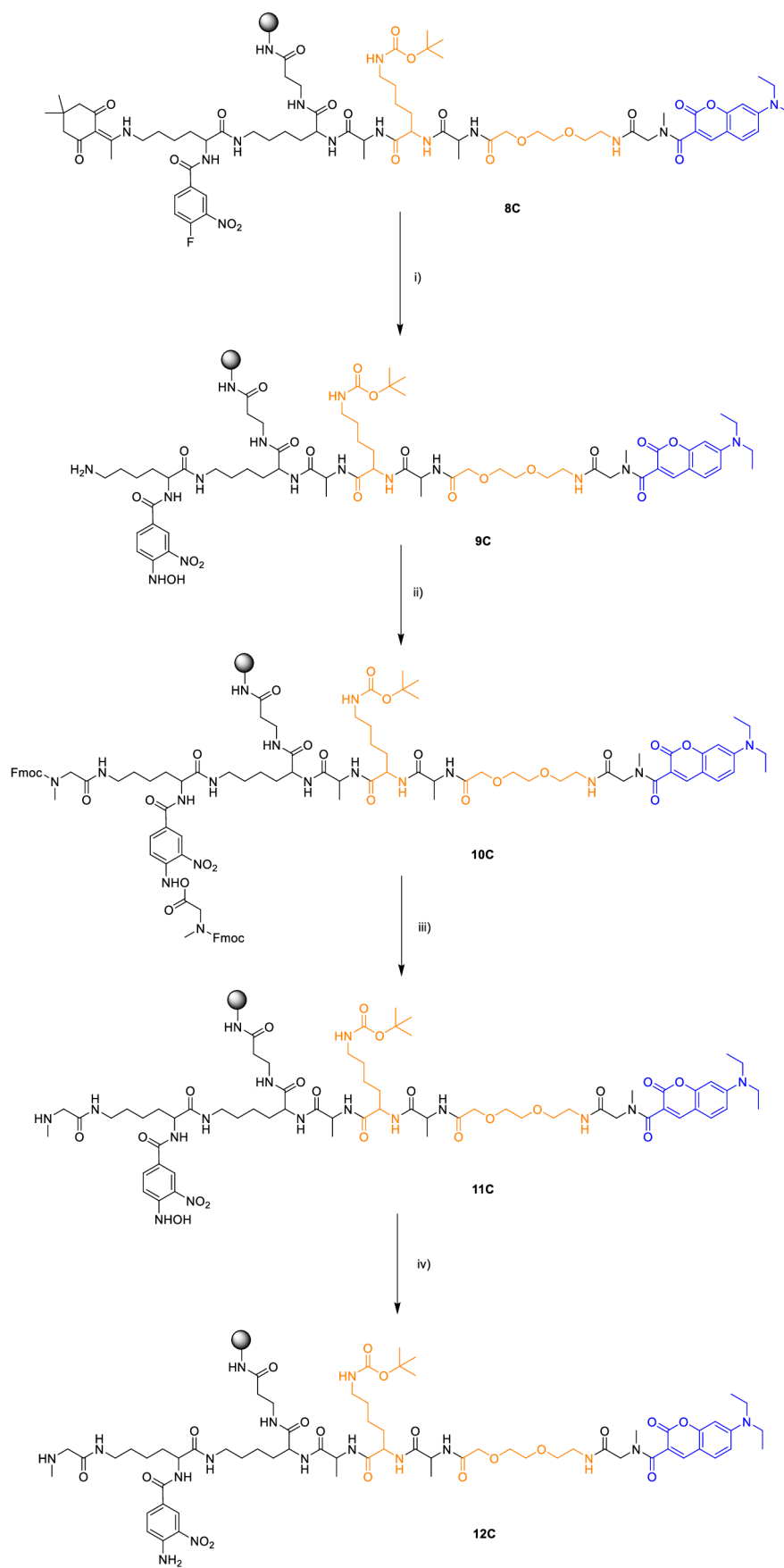


Schéma 5: Koncové kroky syntézy podle Postupu B.

Tab. 6: Reakční podmínky koncových reakcí syntézy podle Postupu B.

	Reakční podmínky	Teplota	Čas
i)	1M NH ₂ OH.HCl pyridin	rt	přes noc
ii)	Fmoc-Sar-OH HOBt, DIC, DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	2 hod
iii)	Piperidin/DMF (1:1, V/V)	rt	15 min
iv)	fluorescein HOBt, DIC, DMAP DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	16 hod

Pozn. U všech acylačních reakcí se pracovalo s koncentracemi roztoků aminokyseliny, fluoresceinu, HOBt, DIC a DMAP 0,2 mol·dm⁻³.

4.3.3 Postup C

V tomto postupu bylo navrženo navázat stavební blok sarkosin-fluorescein (molekula **16**) na intermediát **9C** místo jednotlivých reakcí pryskyřice s Fmoc-Sar-OH, ochránění Fmoc a poté acylace s fluoresceinem. Předpokládalo se, že tímto způsobem dojde k zabránění redukce hydroxylaminu na aminoskupinu.

Stavební blok **15** byl připraven na Wangově pryskyřici, kde se aminokyselina sarkosin navázala na hydroxy skupinu pomocí esterové vazby. Dále se odstranila Fmoc chránící skupina a navázal fluorescein. Celková příprava je popsána ve Schématu 6. Hotový stavební blok **15** byl odštěpen z Wangovy pryskyřice pomocí štěpícího koktejlu TFA v DCM.

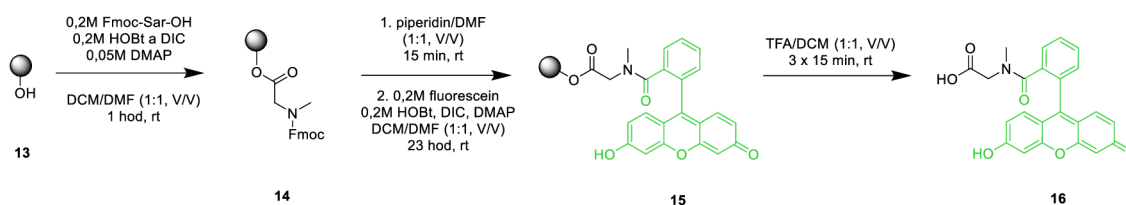


Schéma 6: Příprava stavebního bloku **16**.

Meziprodukt **9C** se nechal reagovat s 0,2M roztokem stavebního bloku **16** s metodikou HOBt a DIC 4 hodiny při pokojové teplotě (Schéma 7). Podle analýzy z LC/MS jsme

zjistili, že opět dochází k redukci hydroxylaminové skupiny na aminoskupinu za vzniku sloučeniny **17C** a stavební blok **16** se nenavázal na volnou aminoskupinu lysinu.

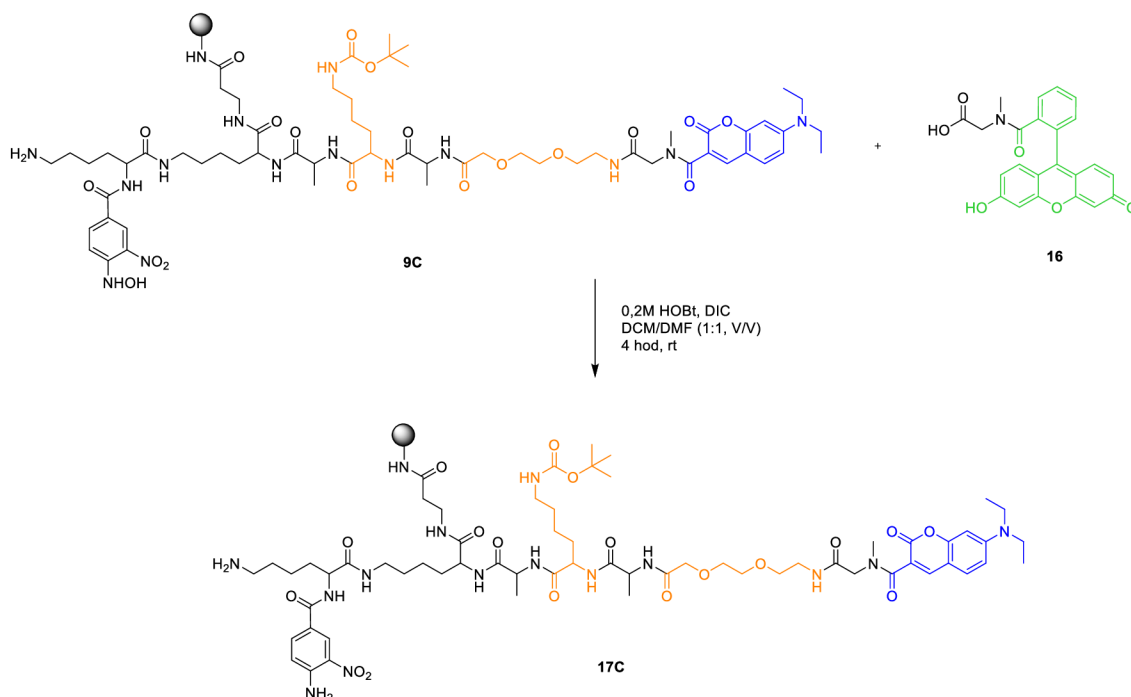


Schéma 7: Acylační reakce intermediátu **9C** se stavebním blokem **16**.

4.3.4 Postup D

Postup D byl realizován stejně jako Postup B s rozdílem, že se hydroxylaminová skupina intermediátu **9C** ochránila pomocí terc-butyldimethylsilyl chloridu (TBDMSCl). Předpokládali jsme, že v tomto případě nebude docházet k redukci hydroxylaminu na amin při reakci s fluoresceinem (Schéma 8).

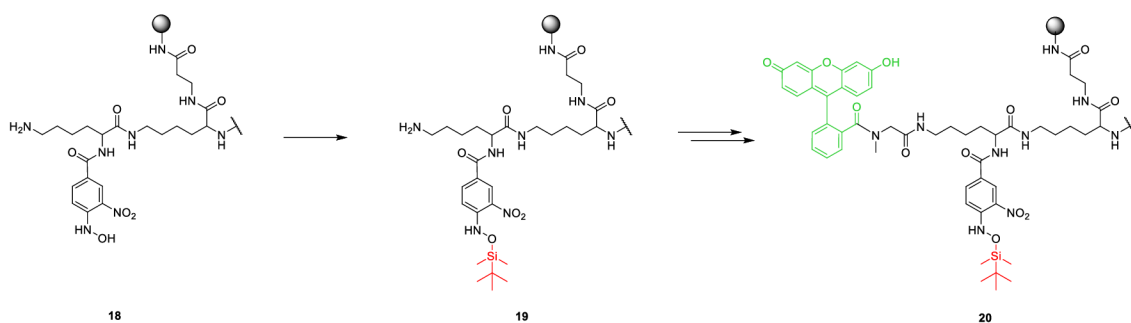


Schéma 8: Nová strategie syntézy podle Postupu D.

Na Schématu 9 (Tab. 7) můžeme vidět, že se intermediát **9C** nechal reagovat s roztokem 0,3M TBDMSCl a 0,4M imidazolu v suchém DMF 16 hodin při pokojové teplotě.

Při přípravě vzorku pryskyřice pro analýzu na LC/MS (štěpení v 50% TFA/DCM) dochází k částečnému nebo úplnému odpadnutí chránící TBDMS skupiny, a proto mohou být analýzy do jisté míry matoucí. Na analýze byly patrné dva dominantní píky. Hmotnost prvního píku s retenčním časem 1,92 minut byla o 28 vyšší než hmotnost intermediátu **9C** a druhého byla o 142 vyšší. Jejich vzájemná hmotnost se lišila o hmotnost použitého silylačního činidla. Z analýzy není možno určit, zda došlo jen k částečné protekci nebo k úplné protekci a částečné hydrolyze u intermediátu **9C** při přípravě vzorku na analýzu. Navíc bylo zřejmé, že na molekule došlo k nějaké neočekávané modifikaci. Tato modifikace byla studována a podle výzkumu skupiny Sakurai a spol.⁶⁰ může docházet při reakci TBDMSCl v přítomnosti imidazolu v suchém DMF k formylaci primárních aminoskupin. Podle této studie máme na pryskyřici nejspíš směs dvou intermediátů **21C** a **22C**, tedy buď zcela nebo jen zčásti protekovanou molekulu na hydroxylaminu (Schéma 9). Tuto teorii s navázaným formylem na aminoskupině jsme ověřili v následujících krocích syntézy.

Pryskyřice se promyla DMF a DCM a nechala reagovat s 0,2M roztokem Fmoc-Sar-OH při pokojové teplotě 5 hodin. Na analýze se opět objevily dva dominantní píky. První pik s retenčním časem 1,96 minut svou hmotností odpovídal meziprojektu **21C** jako při předchozí analýze. Tato část pryskyřice tedy nereagovala se sarkosinem, protože aminoskupina byla bráněná formylem a hydroxylamin byl silylován. Hmotnost druhého píku byla opět o 28 vyšší než hmotnost očekávaného produktu s navázaným sarkosinem. Tato zbylá část pryskyřice se sarkosinem zreagovala, ale nikoliv na aminoskupině lysinu. Předpokládáme, že došlo k vytvoření esterové vazby sarkosinu na volnou hydroxylaminovou skupinu za vzniku sloučeniny **23C** (Schéma 9). Pokud se pryskyřice nechala reagovat s roztokem Fmoc-Sar-OH další 2 hodiny, tak z chromatogramu pik s retenčním časem 1,96 minut zcela zmizel a produktem byl pouze intermediát **23C**. Tudiž chránící TBDMS skupina na hydroxylaminu byla zcela nahrazena sarkosinem, pokud byl dostatečný reakční čas. Intermediát **23C** jsme zreagovali s piperidinem v DMF (1:1, V/V) po dobu 30 minut. Analýza ukázala, že esterová vazba sarkosinu s hydroxylaminem zanikla a regeneroval se volný hydroxylamin na sloučenině **22C**.

Takto jsme potvrdili, že aminoskupina lysinu byla zablokována formylem a že se sarkosin navázal na nechráněný hydroxylamin pomocí esterové vazby, která byla štěpena piperidinem. Pokud by byl sarkosin vázán na lysin amidickou vazbou, tak by při reakci s piperidinem nedošlo k jeho odštěpení.

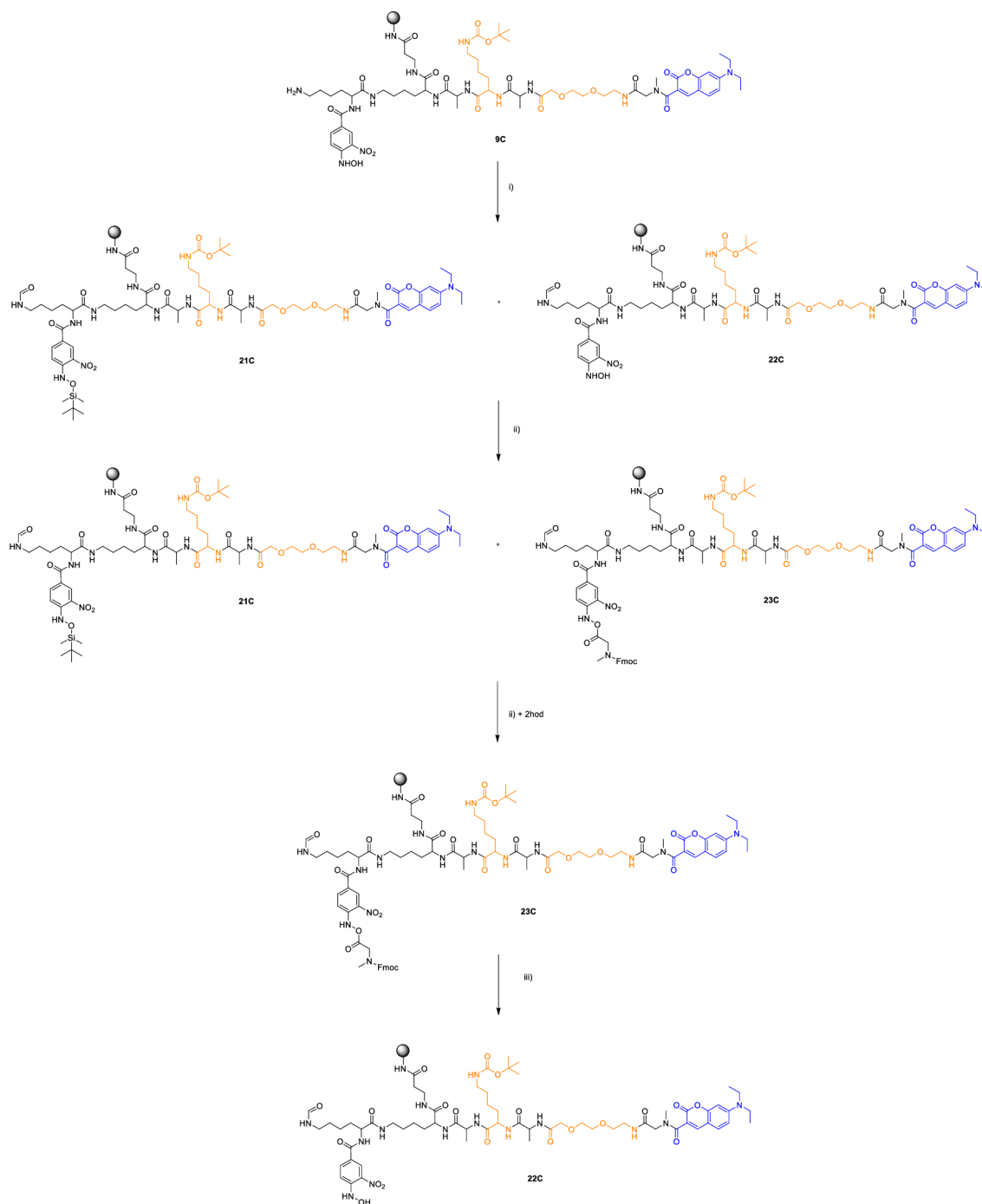


Schéma 9: Reakční kroky syntézy podle Postupu D.

Tab. 7: Reakční podmínky syntézy podle Postupu D.

	Reakční podmínky	Teplota	Čas
i)	0,3M TBDMSCl 0,4M imidazol suchý DMF	rt	16 hod
ii)	0,2M Fmoc-Sar-OH 0,2M HOBt, 0,2M DIC DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	5 hod
iii)	Piperidin/DMF (1:1, V/V)	rt	30 min

Reakce byla optimalizována a místo suchého DMF se pro protekční reakci využila kombinace suchého DCM za přídavku NMP kvůli zvýšení rozpustnosti. Za těchto podmínek nedocházelo k formylaci volné aminoskupiny. Syntéza je shrnuta ve Schématu 10 a Tab. 8. Reakcí s Fmoc-Sar-OH s dostatečným reakčním časem opět došlo k úplnému nahrazení TBDMS chránící skupiny sarkosinem za vzniku derivátu **10C**. Při odstranění Fmoc skupiny 50% roztokem piperidinu v DMF se podle LC/MS analýzy obnovil volný hydroxylamin, čímž vznikla sloučenina **11C**. Proto jsme přistoupili k opakování protekce hydroxylaminu pomocí TBDMS za stejných reakčních podmínek s nadějí, že se nám u vzniklého derivátu **25C** podaří bezpečně navázat fluorescein. V tomto případě se fluorescein na volnou aminoskupinu sarkosinu vázal, ale opět docházelo převážně k redukci hydroxylaminové skupiny, navíc vzniklo velké množství nečistot a pryskyřice se stala prakticky nepoužitelnou.

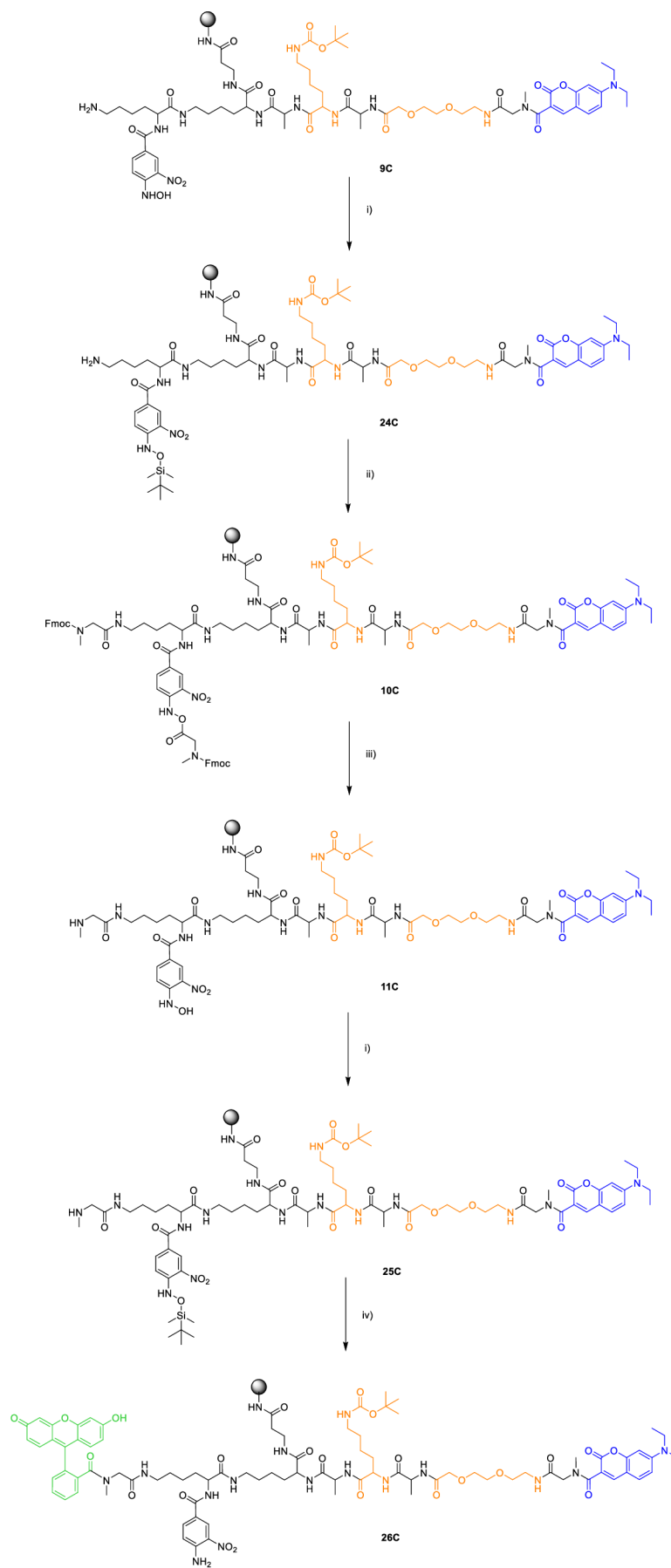


Schéma 10: Optimalizace syntézy podle Postupu D.

Tab. 8: Optimalizované reakční podmínky syntézy podle Postupu D.

	Reakční podmínky	Teplota	Čas
i)	0,3M TBDMS 0,4M imidazol suchý DCM, NMP (1:1, V/V)	rt	16 hod
ii)	Fmoc-Sar-OH HOBt, DIC DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	3 hod
iii)	piperidin/DMF (1:1, V/V)	rt	30 min
iv)	fluorescein HOBt, DIC, DMAP DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	přes noc

Pozn. U všech acylačních reakcí se pracovalo s koncentracemi roztoků aminokyseliny, fluoresceinu, HOBt, DIC a DMAP $0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

4.3.5 Postup E

V tomto postupu bylo navrženo použít Fmoc-Lys(Mtt)-OH místo Fmoc-Lys(Dde)-OH, aby se předešlo problému deprotektce Dde skupiny v přítomnosti fluoresceinu, jak bylo pozorováno při Postupu A. Dále se na aminoskupinu lysinu zbavenou Mtt chránicí skupiny měl navázat stavební blok **36** složený z 4-fluoro-3-nitrobenzoové kyseliny, která nesla přes amidickou vazbu navázaný alanin a fluor v pozici 4 byl substituován hydroxylaminem. Strategie navázání celého stavebního bloku **36** byla zvolena z důvodu, aby tento krok syntézy byl posledním a hydroxylaminová skupina se nemohla redukovat na aminoskupinu. Tyto záměry jsou přehledně znázorněné ve Schématu 11.

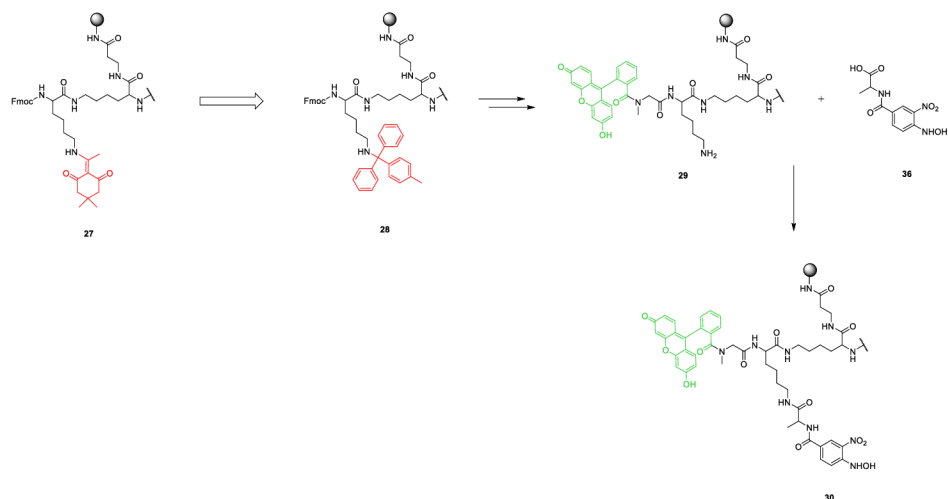


Schéma 11: Záměry syntézy podle Postupu E.

Stavební blok **35** se připravil opět na pevné fázi s použitím Wangovy pryskyřice (Schéma 12). Z pryskyřice **13** se odstranila Fmoc chránící skupina pomocí piperidinu v DMF (1:1, V/V) a poté se nechala reagovat s 0,3M roztokem Fmoc-Ala-OH s použitím HOBt, DIC a DMAP při pokojové teplotě přes noc. Dále se opět ochránil Fmoc a nasadila se reakce s 0,3M roztokem 4-fluoro-3-nitrobenzoovou kyselinou s metodikou HOBt a DIC při laboratorní teplotě přes noc. Nakonec bylo potřeba fluor substituovat hydroxylaminovou skupinou, a to pomocí 1M roztoku $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ v pyridinu opět při laboratorní teplotě přes noc. Jak bylo zmíněno výše, po takovéto reakci bylo nutno pryskyřici důkladně promýt a vysušit, použili jsme stejnou sekvenci jako v předchozím případě (viz. kapitola 5.3.2). Po vysušení bylo potřeba stavební blok **35** odštěpit z pryskyřice za pomoci štěpícího koktejlu 50% TFA v DCM.

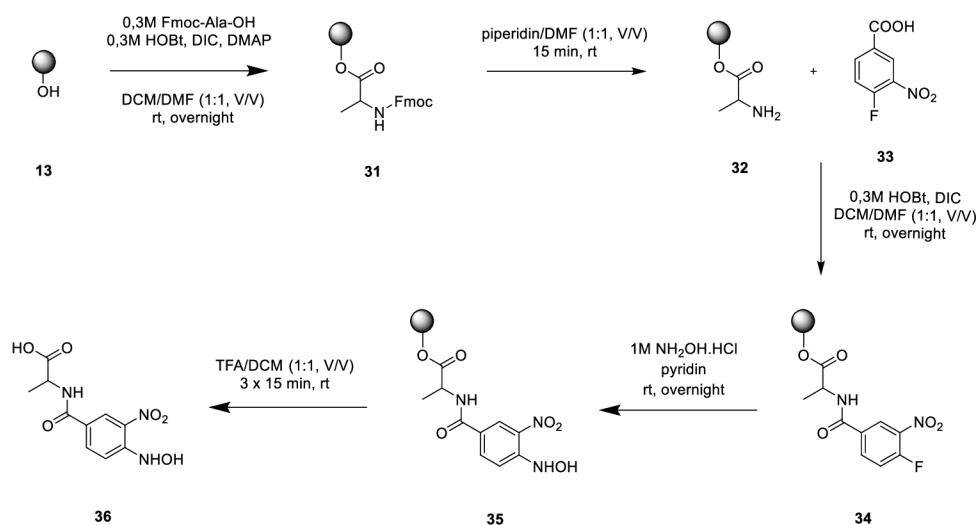


Schéma 12: Příprava stavebního bloku **36**.

Postup E je shrnut ve Schématu 13 (Tab. 9). Z intermediátu **4C** se odchránila Dde skupina a navázal se Fmoc-Lys(Mtt)-OH. Dále se pokračovalo odchráněním Fmoc, navázáním sarkosinu, opět odchránění Fmoc a připojení fluoresceinu za vzniku sloučeniny **38C**. Odchránění Mtt chránící skupiny probíhalo odlišně než u předchozích deprotekcí a to za pomoci směsi hexafluoro-2-propanolu a 2,2,2-trifluorethanolu. Z časových důvodů byla reakce ukončena po 3,5 hodinách. Kontrolní analýza na LC/MS po odchránění Mtt potvrdila, že lysin nebyl reakcí zcela deprotekován, protože na chromatogramu byl patrný pík odpovídající jeho hmotnosti. Pokud by byla pryskyřice zcela zbavená Mtt skupiny, pak by byla vymyta po reakci a na analýze bychom ji neviděli. Neúplná deprotekce nám ale nevadila, protože intermediát **39C** byl stejně použit pouze pro testovací reakci, která proběhla s 0,2M roztokem stavebního bloku **36** s metodikou HOBt a DIC při laboratorní teplotě 3 hodiny. Nevznikl žádný produkt, a proto se v reakci pokračovalo po dobu dalších 17 hodin při 40 °C. Ani takto nevznikl kýžený produkt, a bylo tedy potřeba opět přistoupit ke změně syntetického přístupu.

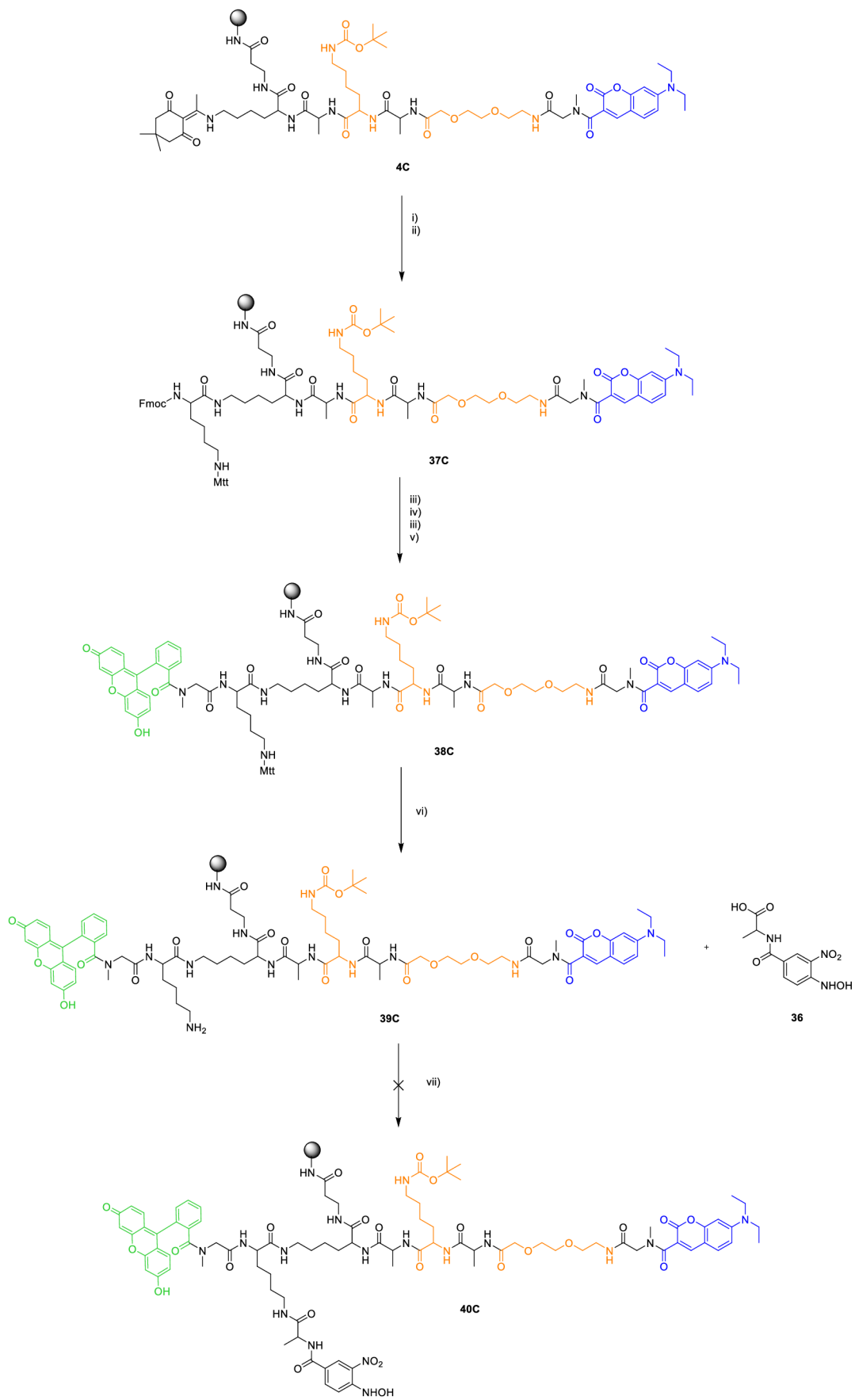


Schéma 13: Příprava první části sondy podle Postupu E.

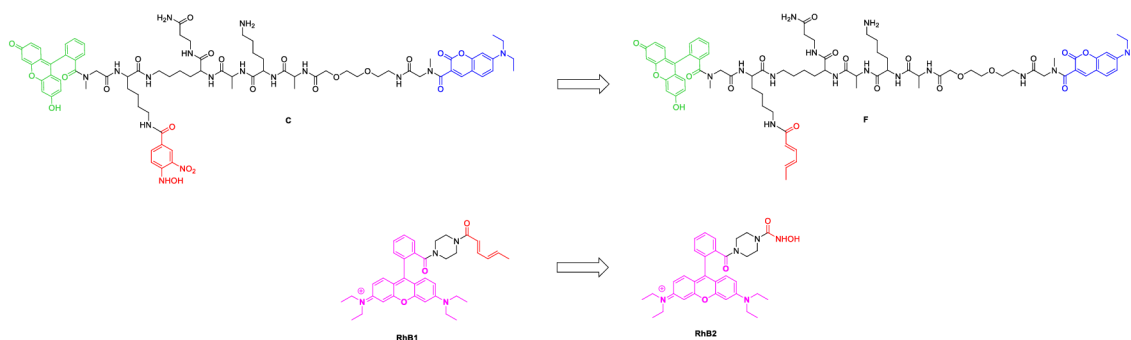
Tab. 9: Reakční podmínky pro přípravu podle Postupu E.

	Reakční podmínky	Teplota	Čas
i)	0,907M NH ₂ OH.HCl, 0,632M imidazol NMP/DCM (3:2, V/V)	rt	3 hod
ii)	Fmoc-Lys(Mtt)-OH HOBt, DIC, DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	2 hod
iii)	piperidin/DMF (1:1, V/V)	rt	15 min
iv)	Fmoc-Sar-OH HOBt, DIC, DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	2 hod
v)	fluorescein HOBt, DIC, DMAP DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	16 hod
vi)	1,25M triethylsilan 0,95M hexafluoro-2-propanol 0,66M 2,2,2-trifluoroethanol 8,21M 1,2-dichlorethan	60 °C	3,5 hod
vii)	0,2M stavební blok 36 HOBt, DIC DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	3 hod
		40 °C	17 hod

Pozn. U všech acylačních reakcí se pracovalo s koncentracemi roztoků aminokyseliny, fluoresceinu, HOBt, DIC a DMAP 0,2 mol·dm⁻³.

4.3.6 Postup F

V tomto postupu jsme navrhli modifikovat obě části sondy a to tak, že bychom zaměnili jejich funkční skupiny. Na první části sondy modifikaci **C** má být navázaná hydroxylaminová skupina a na druhé části sondy **RhB1** konjugovaný dien představovaný sorbovou kyselinou. Návrh v Postupu F tedy zněl, že první část sondy ponese sorbovou kyselinu za vzniku sondy **F** a na druhou část sondy se zavede hydroxylamin za vzniku sloučeniny **RhB2** (Obr. 47). Tímto krokem jsme se chtěli vyhnout jakékoliv interakci fluoresceinu s hydroxylaminem.



Obr. 47: Navržené změny (červeně vyznačené) první i druhé části sondy podle Postupu F.

Postup F byl realizován identickým postupem jako Postup E, avšak v posledním kroku se místo stavebního bloku **36** navázala kyselina sorbová (Schéma 14, Tab. 10). Reakce probíhala s 0,2M roztokem kyseliny sorbové s metodikou HOBt a DIC v DCM/DMF (1:1, V/V) při laboratorní teplotě 3 hodiny. Analýza z LC/MS nám potvrdila výskyt produktu, a tak se nám podařilo syntetizovat modifikovanou první část sondy jako sloučeninu **41C** podle Postupu F.

Modifikovanou druhou část sondy **RhB2** připravoval kolega MSc. David Miličević, Ph.D a zjistil, že takto navrženou molekulu (Obr. 47) nelze připravit. Opět docházelo k neočekávaným interakcím hydroxylaminu tentokrát s molekulou rhodaminu B. Druhou část sondy **RhB2** tedy nebylo možné syntetizovat a opět jsme museli zvolit jinou cestu pro přípravu první části sondy **C**.

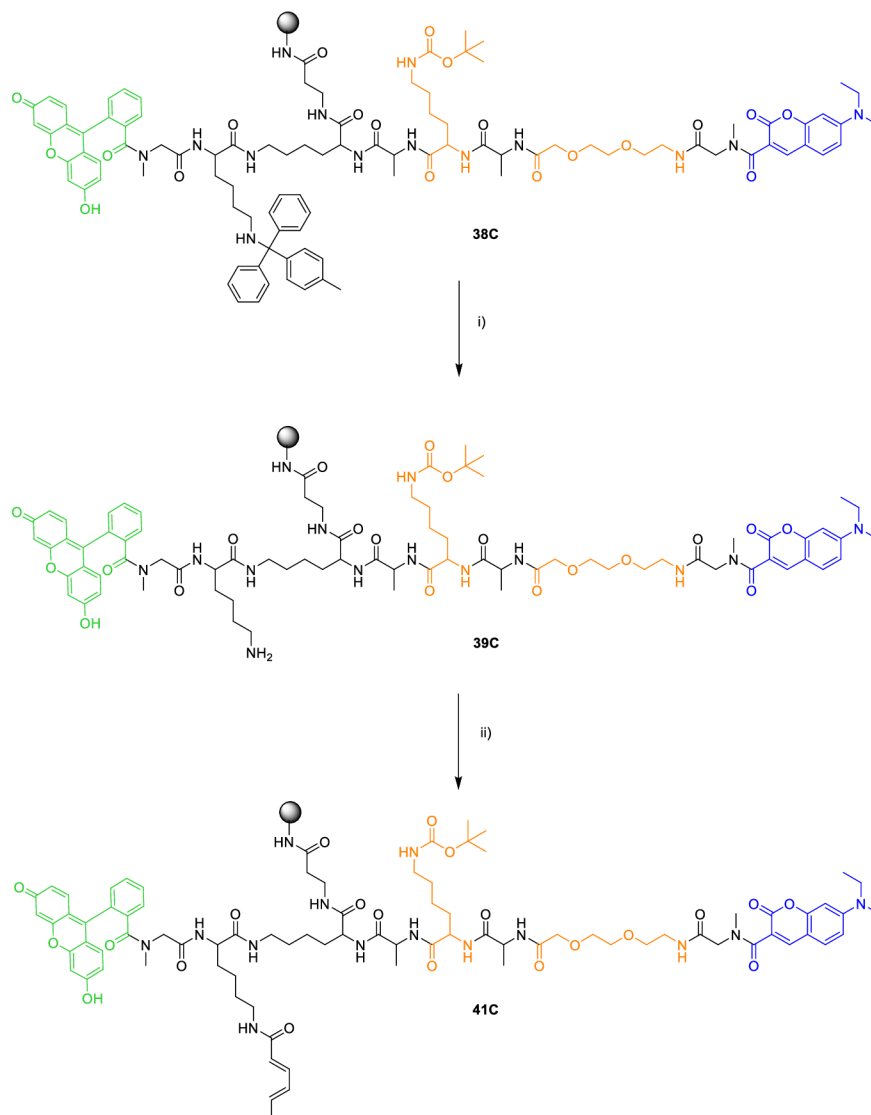


Schéma 14: Příprava první části sondy podle Postupu F.

Tab. 10: Reakční podmínky pro přípravu podle Postupu F.

	Reakční podmínky	Teplota	Čas
i)	1,25M triethylsilan 0,95M hexafluoro-2-propanol 0,66M 2,2,2-trifluoroethanol 8,21M 1,2-dichlorethan	60 °C	3,5 hod
ii)	0,2M kyselina sorbová 0,2M HOBt, 0,2M DIC DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	3 hod

4.3.7 Postup G

Tento postup byl navržen a v analytickém množství úspěšně ověřen konzultantem MSc. Davidem Miličevičem, Ph.D, já jsem tento postup aplikovala na větší množství pryskyřice. Strategie spočívala v tom, že se opět použil lysin s protekovanou koncovou aminoskupinou pomocí Mtt jako v Postupu E a F, a navíc se vynechala aminokyselina sarkosin z peptidového řetězce. Postup je obecně znázorněn na Schématu 15.

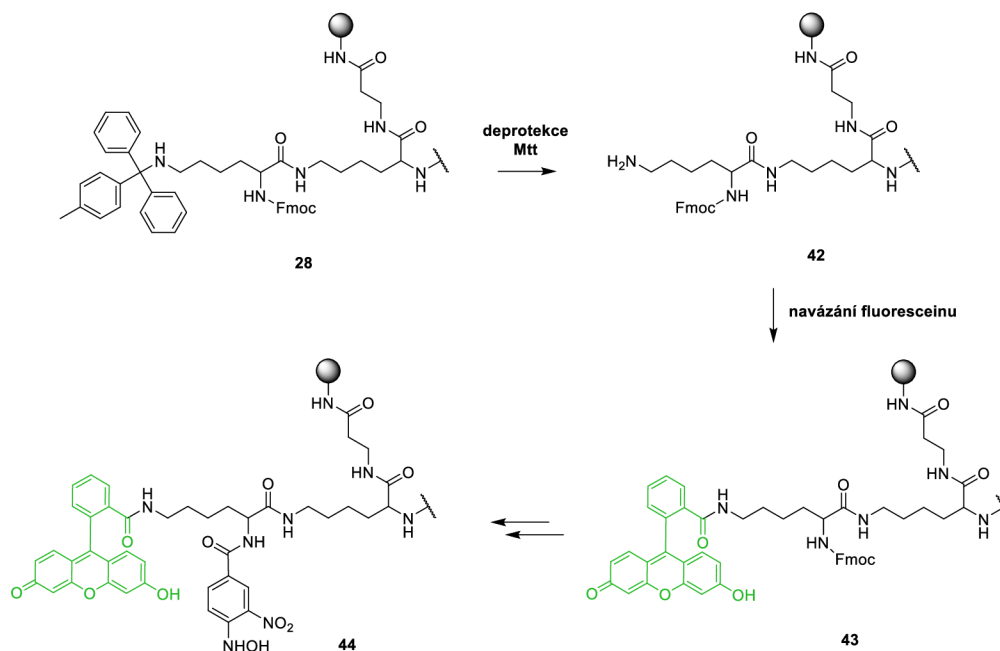
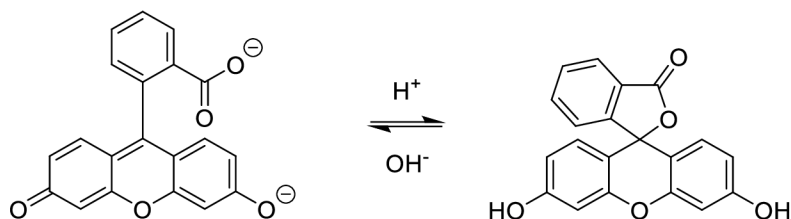


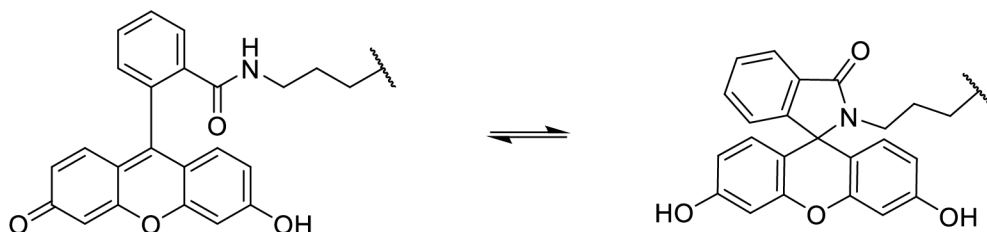
Schéma 15: Obecné schéma přístupu k syntéze v Postupu G.

Klíčem k úspěchu syntézy bylo právě vynechání aminokyseliny sarkosinu a navázání molekuly fluoresceinu rovnou na odchráněnou aminoskupinu lysinu, jakožto na primární amin. Fluorescein se ze zkušenosti vázal na sekundární aminy, a to z prostého důvodu. Fluorescein je pH dependentní a má dvě formy. V bazickém prostředí je v tzv. otevřené formě a nese záporný náboj, naopak v kyselém prostředí dochází k protonizaci a zavření molekuly, čímž dojde k vytvoření laktonu neboli cyklického esteru (Obr. 48).



Obr. 48: Závislost fluoresceinu na pH prostředí.

V původním návrhu první části sondy byl fluorescein navázaný přes amidovou vazbu na sekundární amin (sarkosin), aby se zabránilo nechtěné cyklizaci. Avšak jeho navázáním na primární amin se situace mění a zde může docházet k vytvoření laktamu neboli cyklického amidu (Obr. 49). Nicméně se navázání fluoresceinu na primární aminoskupinu zdálo jako jediná možnost úspěšně dokončit syntézu první části sondy.



Obr. 49: Tvorba laktamu způsobená vazbou na primární amin.

Syntetické kroky jsou znázorněny na Schématu 16 (Tab. 11). Intermediát **4C** se ochránil pomocí 0,4M roztoku $N_2H_4 \cdot H_2O$ v DMF z důvodu úspory času a zopakování syntetických kroků přesně tak, jak je provedl konzultant MSc. David Miličević, Ph.D. Poté se navázala aminokyselina Fmoc-Lys(Mtt)-OH, následně se deprotekovala Mtt skupina a místo ní se navázal fluorescein. Analýza z LC/MS nebyla zcela čistá, kromě dominantního píku molekuly **45C** se vyskytovaly i nečistoty. Zjistili jsme, že protektivní Mtt skupina nebyla zcela odstraněna, a proto jsme při dalším zopakování reakce zvýšili reakční dobu deprotektce na 7 hodin. Za těchto reakčních podmínek byla aminoskupina zcela ochráněná. Ověřili jsme to jednoduchou reakcí analytického množství pryskyřice s ochráněnou aminoskupinou s Fmoc-Ala-OH, kdy na analýze byl patrný pouze jeden pík odpovídající produktu.

Dále se deprotekovala Fmoc skupina a nasadila se reakce s 4-fluoro-3-nitrobenzoovou kyselinou. Posledním krokem byla substituce atomu fluoru za hydroxylamin. Využil se opět 1M roztok $NH_2OH \cdot HCl$ v pyridinu a reagovalo se přes noc. Po reakci bylo potřeba pryskyřici řádně promýt, použil se osvědčený způsob: $10 \times$ pyridin, $10 \times$ 1% AcOH/DMF, $10 \times$ 20% H_2O /DMF, $10 \times$ DMF, $10 \times$ DCM, $3 \times$ MeOH a pryskyřici zcela vysušit proudem dusíku.

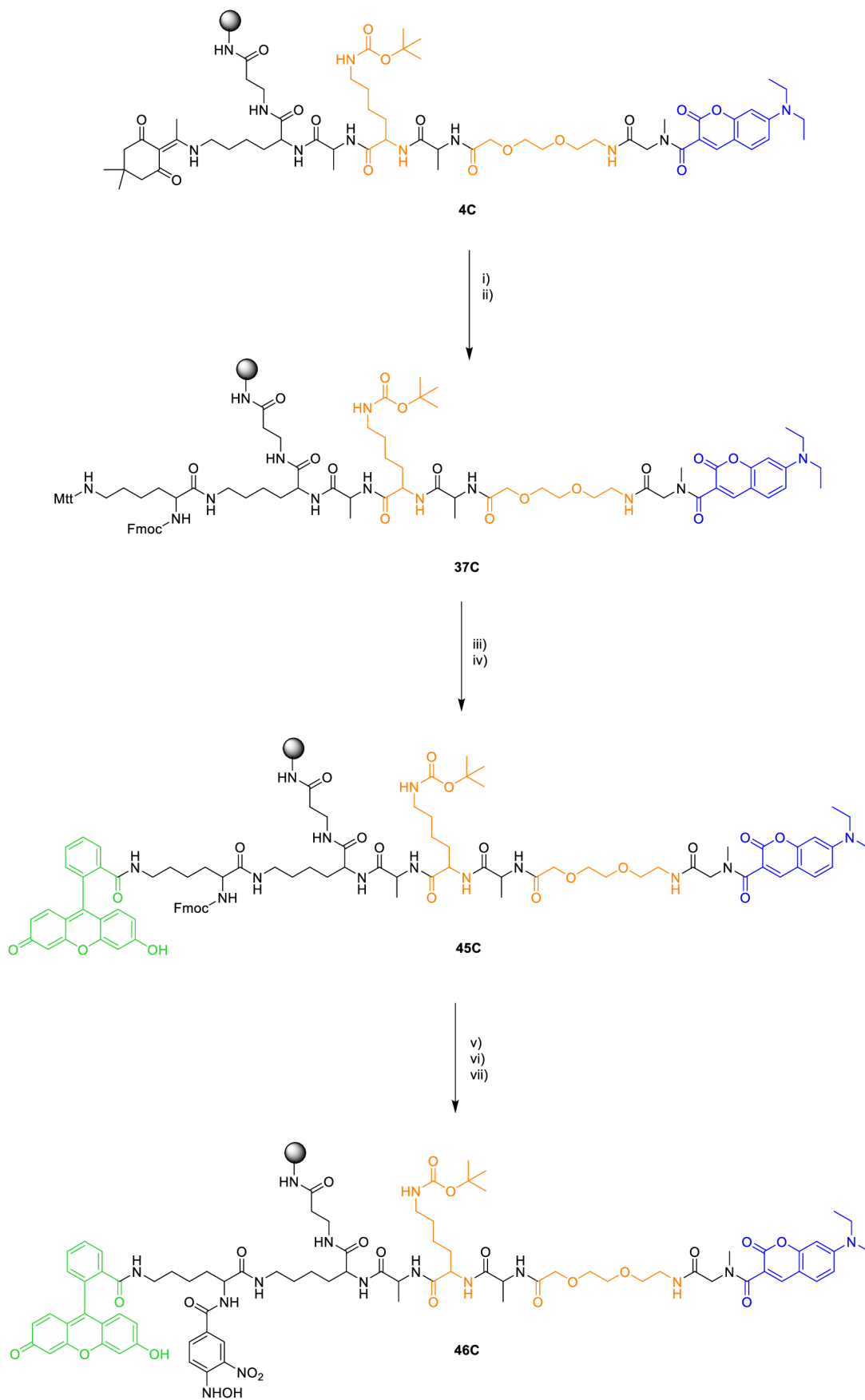


Schéma 16: Příprava první části sondy podle Postupu G.

Tab. 11: Reakční podmínky přípravy podle Postupu G.

	Reakční podmínky	Teplota	Čas
i)	0,4M N ₂ H ₄ .H ₂ O DMF	rt	3 × 3 min
ii)	Fmoc-Lys(Mtt)-OH HOBt, DIC DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	2 hod
iii)	1,25M triethylsilan 0,95M hexafluoro-2-propanol 0,66M 2,2,2-trifluoroethanol 8,21M 1,2-dichlorethan	60 °C	5 → 7 hod
iv)	fluorescein HOBt, DIC, DMAP DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	18 hod
v)	piperidin/DMF (1:1, V/V)	rt	15 min
vi)	4-fluoro-3-nitrobenzoová kyselina HOBt, DIC DCM/DMF (1:1, V/V)	rt	7 hod
vii)	1M NH ₂ OH.HCl pyridin	rt	přes noc

Pozn. U všech acylačních reakcí se pracovalo s koncentracemi roztoků kyseliny, fluoresceinu, HOBt, DIC a DMAP 0,2 mol·dm⁻³.

Analýza na LC/MS ukázala mnoho nečistot, ale dominantní pík odpovídal požadovanému produktu **46C**. Následně bylo potřeba sloučeninu **46C** odštěpit z pryskyřice pomocí koktejlu 50% TFA v DCM a zcela usušit na lyofilizátoru. Nakonec se odštěpená směs z pryskyřice přečistila za pomoci semi-preparativní HPLC za zisku konečné modifikace **E** první části sondy.

Z časových důvodů nebyly syntetizovány zbylé tři modifikace první části sondy **A**, **B** a **D** podle Postupu G. U fluorescenčních měření se pracovalo pouze se sloučeninou **E** a molekulou **RhB1**.

4.4 Zkušební hetero Diels-Alderova reakce na modelovém systému

V průběhu syntézy první části sondy jsme ověřili a následně optimalizovali hetero Diels-Alderovu cyklizaci na modelovém systému (Schéma 17). Použili jsme druhou část sondy **RhB1** a připravený stavební blok **36** (syntéza viz. kapitola 5.3.5). Na základě zkušeností kolegu z výzkumné skupiny jsme se rozhodli jako rozpouštědlo použít jednoduchý alkohol. Pouze zkušebně bez definovaných koncentrací látek jsme provedli v analytickém měřítku reakci sloučeniny **RhB1** s molekulou **36** v methanolu, ethanolu, propan-1-olu a butan-1-olu s přidavkem 100 μl 33% H_2O_2 v celkovém objemu 1 ml. Po jedné hodině se provedla LC/MS analýza. Nejčistější chromatogram měl ethanol (EtOH) jako rozpouštědlo, a proto jsme dál pracovali s ním.

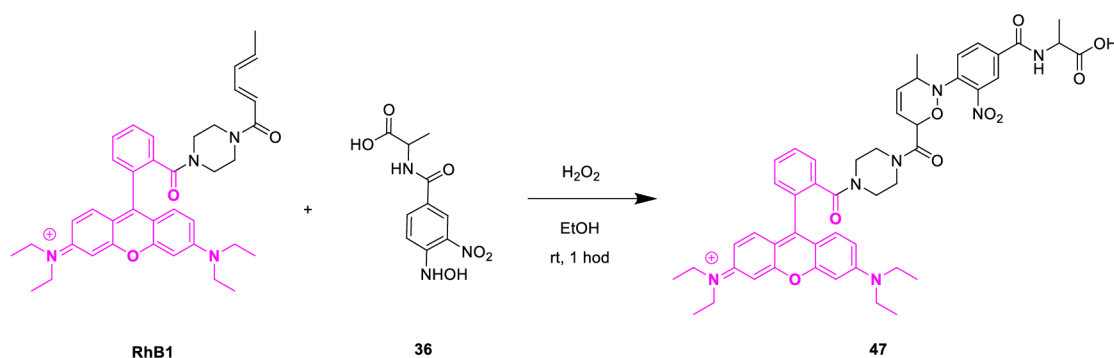
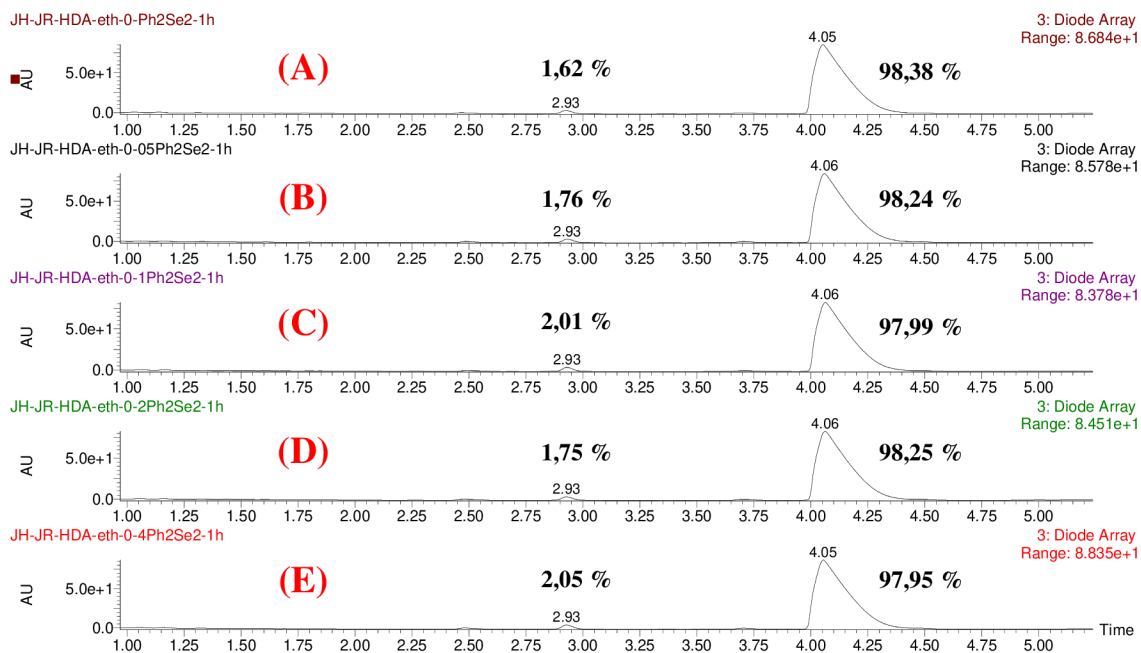


Schéma 17: Zkušební hetero Diels-Alderova reakce na modelovém systému.

4.4.1 Katalyzátor

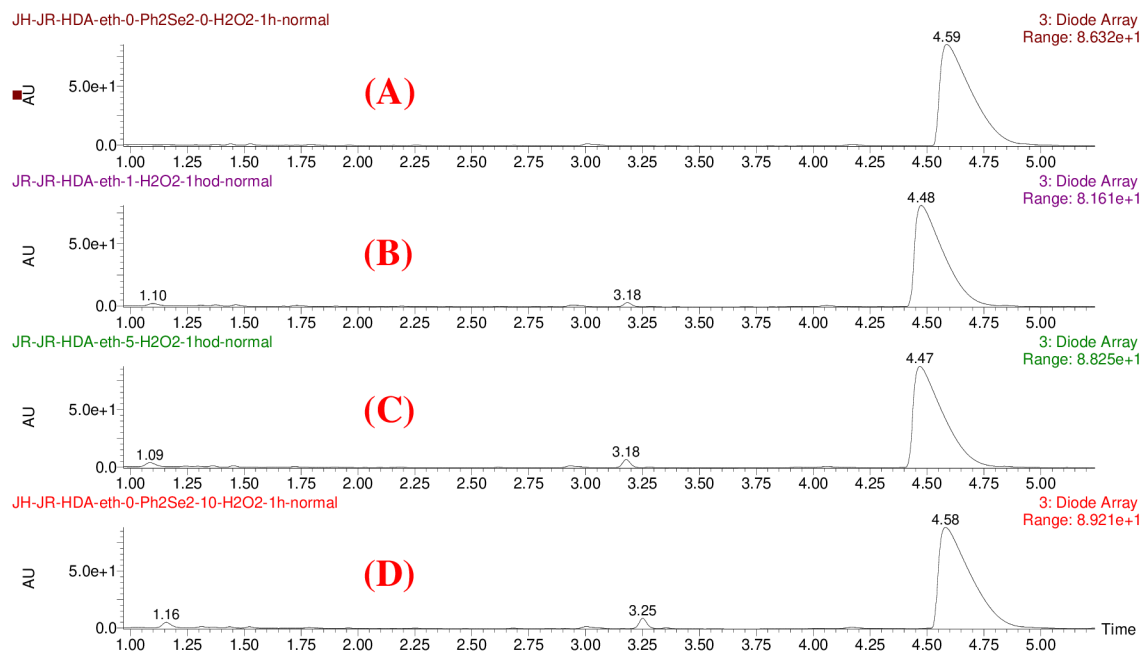
Podle studie skupiny Zhao a spol.³⁷ jsme použili katalyzátor difenyldiselenid (Ph_2Se_2). Komponenty **RhB1** (3,71 μmol) a **36** (3,71 μmol) se rozpustili v 1 ml EtOH s 50 ekv. 33% H_2O_2 (17 μl) a zkoumalo se nejmenší potřebné množství katalyzátoru Ph_2Se_2 . Experimenty byly provedeny s 0; 0,05; 0,1; 0,2 a 0,4 ekvivalenty Ph_2Se_2 . Reakce byla prováděna 1 hodinu a poté se roztoky analyzovaly na LC/MS. Výsledky jsou srovnány na Obr. 50. Pík s retenčním časem 2,93 min odpovídá produktu **47** a pík 4,05 min pak výchozí sloučenině **RhB1**. Po jejich zintegrování jsme zjistili, že se množství produktu ve všech měření nijak výrazně neliší, a tudíž katalyzátor Ph_2Se_2 nebyl pro naše účely potřebný.



Obr. 50: Analýzy LC/MS z měření **RhB1** a molekuly **36** s 33% H₂O₂ (50 ekv.) v EtOH (A) bez katalyzátoru, (B) 0,05 ekv., (C) 0,1 ekv., (D) 0,2 ekv. a (E) 0,4 ekv.

4.4.2 Detekce peroxidu vodíku

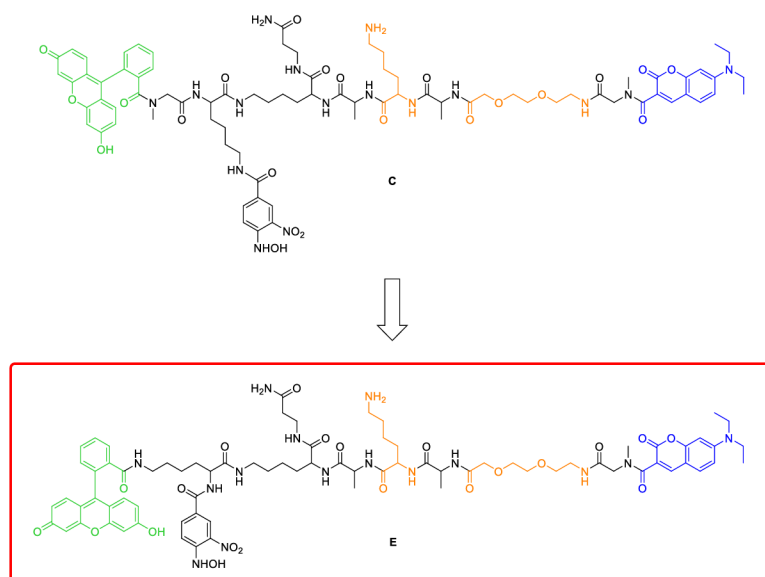
Dalším úkolem bylo zjistit, jaké je nejmenší detekovatelné množství H₂O₂. Provedli jsme reakci **RhB1** (3,71 μmol) s **36** (3,71 μmol) v EtOH opět 1 hodinu bez H₂O₂ a poté s koncentrací 0,0037; 0,0191 a 0,0371 mol·dm⁻³. Výsledky jsme analyzovali opět na LC/MS. Jak můžeme vidět na Obr. 51, reakcí bez peroxidu nevzniká produkt **47**. Při použití H₂O₂ v koncentraci 0,0037 mol·dm⁻³ můžeme po 1 hodině pozorovat pík 3,18 min odpovídající produktu **47**. Tudíž můžeme říct, že pomocí měření na LC/MS jsme schopni pomocí modelového systému detekovat H₂O₂ v koncentraci 0,0037 mol·dm⁻³ po 1 hodině měření.



Obr. 51: Analýzy LC/MS z měření **RhB1** a **36** v EtOH 1 hodinu. (A) $0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$,
 (B) $0,0037 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, (C) $0,0191 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, (D) $0,0371 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

5. Fluorescenční měření

Pro fluorescenční měření se používala pouze modifikace první části sondy **E** připravená podle Postupu G. Od původního návrhu se odlišuje tím, že neobsahuje aminokyselinu sarkosin a fluorescein je vázán rovnou na ϵ -aminoskupinu lysinu (Obr. 52).

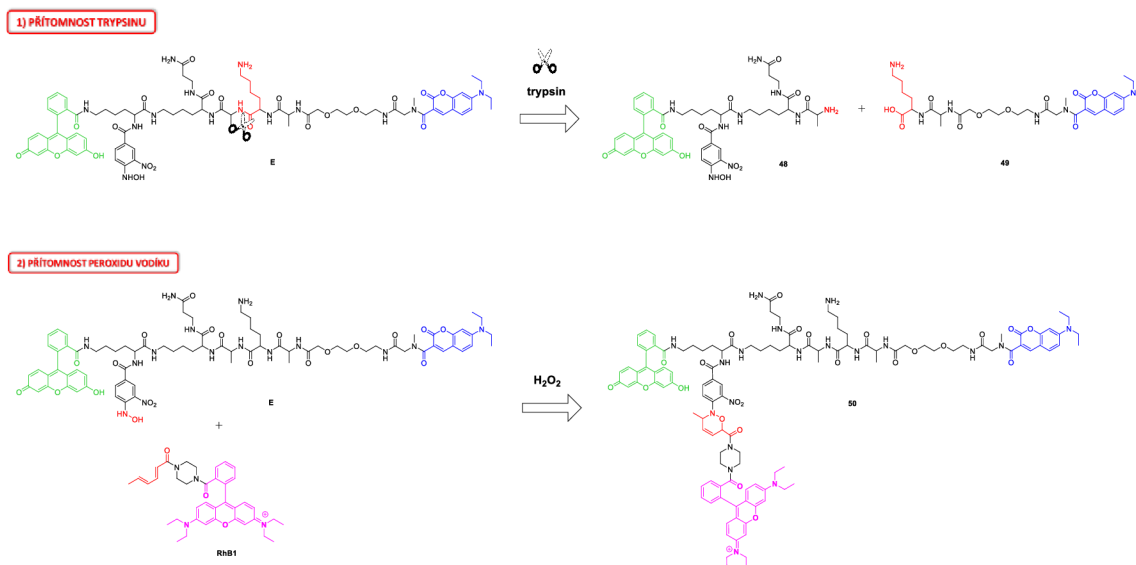


Obr. 52: Optimalizovaná podoba první části sondy **E**.

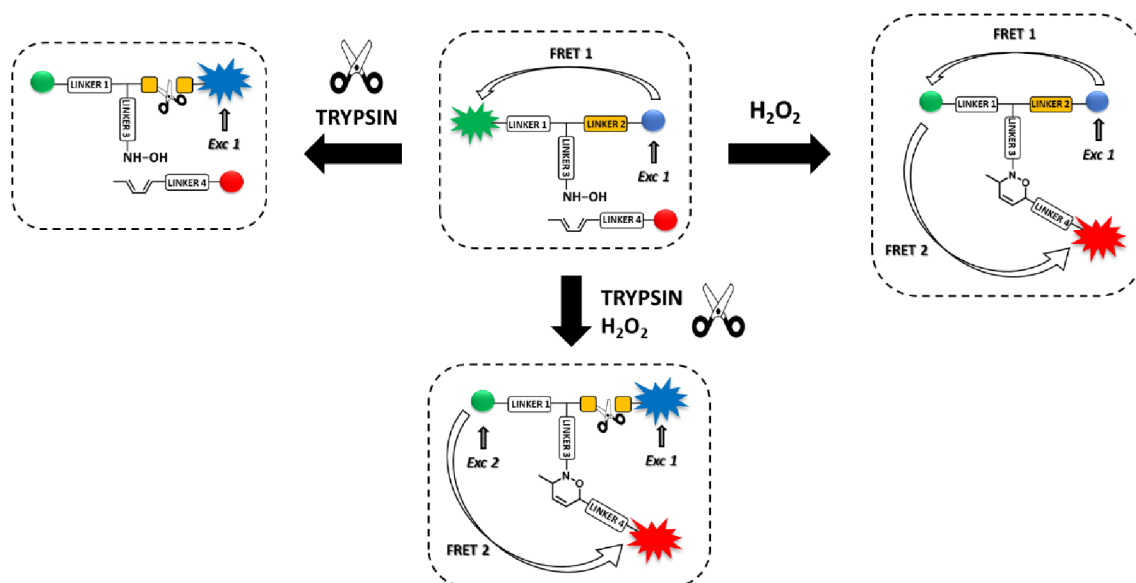
Než se pustíme do zhodnocení naměřených fluorescenčních spekter, je potřeba si vysvětlit, na jakém principu má multifunkční fluorescenční sonda fungovat. Námi navržená sonda má reflektovat přítomnost peroxidu vodíku a proteázy trypsinu. Jak bylo řečeno, sonda se skládá ze dvou částí. První část sondy **E** obsahuje v peptidovém řetězci specifické místo, kde v přítomnosti trypsinu bude docházet k hydrolyze peptidové vazby. Dále je v molekule zavedená hydroxylaminová skupina, která má být oxidována H_2O_2 na nitrosoderivát, který by měl fungovat jako dienofil v hetero Diels-Alderově reakci. Dien je představován kyselinou sorbovou, která je obsažena v molekule druhé části sondy **RhB1**. Reakce sondy **E/RhB1** na výskyt H_2O_2 a trypsinu jsou znázorněny na Obr. 53.

Multifunkční fluorescenční sonda **E/RhB1** je založená na dvojitým Försterově rezonančním přenosu energie (FRET). Jako první donor zde vystupuje molekula DEAC a příslušným akceptorem je fluorescein, jehož excitační pás se překrývá s emisním pásem DEAC. Takže mezi fluorescenčními barvivy DEAC a fluorescein bude docházet k FRETU 1 při excitaci 1 za normálních podmínek. Pokud bude v roztoku přítomna proteáza trypsin, pak dojde k hydrolyze peptidového řetězce a FRET 1 bude přerušen.

V případě, že se v roztoku bude vyskytovat H_2O_2 , pak dojde k oxidaci hydroxylaminové skupiny na příslušný nitrosoderivát, který bude reagovat s dienem na molekule **RhB1** za vytvoření oxazinového kruhu. V takovém případě bude fluorescein donorem energie pro rhodaminovou část, protože dojde k překrytí excitačního pásu rhodaminu s emisním pásem fluoresceinu, a bude aktivní FRET 1 i FRET 2. V situaci, kdy se v roztoku nachází jak H_2O_2 , tak trypsin, pak bude aktivní pouze FRET 2 při excitaci 2. Celý princip detekce je přehledně zobrazen na Obr. 54.



Obr. 53: Reakce sondy **E/RhB1** na přítomnost H_2O_2 a trypsinu.



Obr. 54: Obecný princip detekce H_2O_2 a trypsinu multifunkční sondou **E/RhB1**.

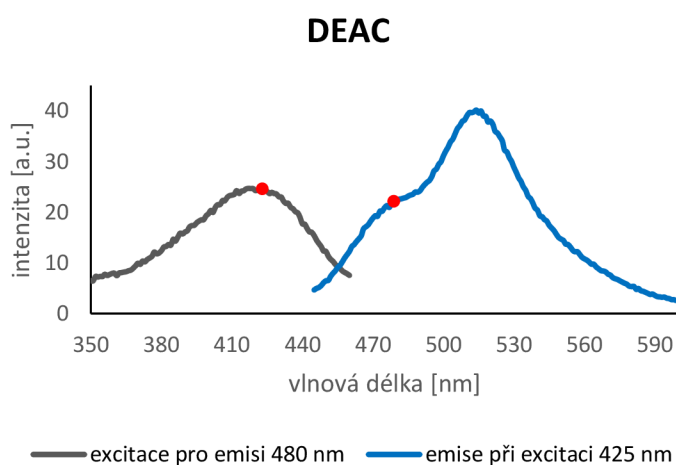
Základem našeho výzkumu je pozorování změn ve fluorescenčních profilech fluoroforů DEAC, fluoresceinu a rhodaminu B v reakci na přítomnost H_2O_2 a trypsinu. V této kapitole si nejdříve uvedeme základní charakteristiku obou částí sondy **E/RhB1**. Podíváme se na fotostabilitu molekul **E** a **RhB1** v různých roztocích při definované teplotě a na závislost molekuly **E** na změny teplot. Popíšeme si chování sondy **E** v přítomnosti různých koncentrací trypsinu. A nakonec se zaměříme na odezvu sondy **E/RhB1** na přítomnost H_2O_2 . Všechna spektra byla z časových důvodů měřena pouze jednou.

5.1 Základní charakteristika

Při měření excitačních a emisních spekter se pracovalo s koncentrací 10 μ M sloučeniny **E** i molekuly **RhB1** v roztoku 10% DMSO v TRIS pufru (pH = 8). TRIS pufr byl zvolen kvůli jeho rozsahu pH přibližně 7–9, což se shoduje s fyziologickým pH většiny živých organismů. Přídavek DMSO byl nutný skrze špatnou rozpustnost sondy **E** v samotném TRIS pufru, jak bylo zmíněno v kapitole 5.2.

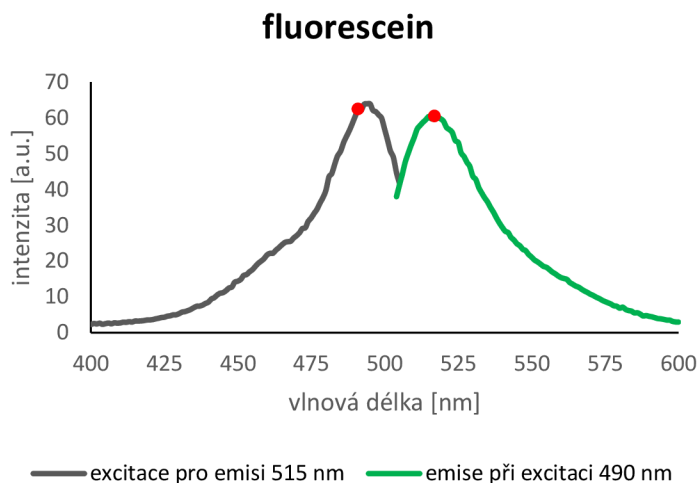
Vzorek se tedy rozpustil v čistém DMSO, a poté se vhodně naředil předem vytemperovaným TRIS puforem na 37 °C. Následně se roztok přefiltroval do kyvety a nechal se 5 minut temperovat na 37 °C, než se přešlo k samotnému měření spekter.

Sonda **E** nese fluorofor DEAC a fluorescein. Excitační spektrum DEAC (Graf 1) se měřilo pro emisi v maximu 480 nm, emisní spektrum pak při excitaci v maximu 425 nm. Na emisním spektru můžeme vidět i pík odpovídající fluoresceinu s maximem 515 nm. Fluorescein je tedy možné excitovat i vlnovou délkou 425 nm.



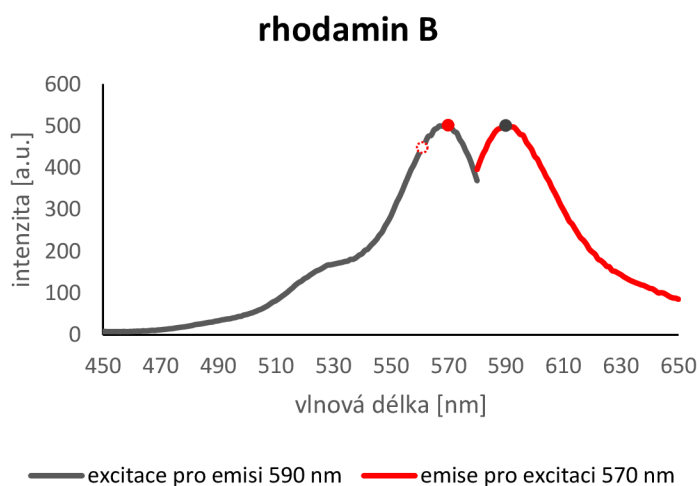
Graf 1: Excitační a emisní spektrum molekuly **E** s vyznačenými maximy.

Excitační spektrum fluoresceinu (Graf 2) se měřilo pro emisi v maximu 515 nm, emisní spektrum pak při excitaci v maximu 490 nm. Je zřejmé, že DEAC ve svém spektru vykazuje větší Stokesův posun než fluorescein.



Graf 2: Excitační a emisní spektrum molekuly **E** s vyznačenými maximy.

Molekula **RhB1** obsahuje pouze jeden fluorofor a to rhodamin B. Jeho excitační spektrum bylo změřeno pro emisi v maximu 590 nm, emisní spektrum pak při excitaci v maximu 570 nm (Graf 3).

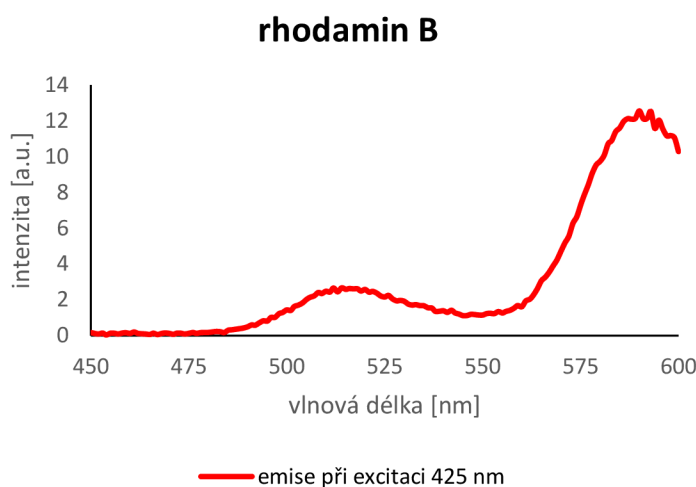


Graf 3: Excitační a emisní spektrum molekuly **RhB1** s vyznačenými maximy (bílá značka odpovídá vlnové délce přibližně 560 nm).

Ačkoliv bylo zjištěno, že rhodamin má excitační maximum přibližně v bodě 570 nm, tak se pro všechna experimentální měření používala excitace při vlnové délce 560 nm. Bylo

to z toho důvodu, že jsme excitační a emisní spektra změřili až ke konci prováděných experimentů a vlnová délka 560 nm je běžně používaná jako excitační maximum pro rhodamin B.

Protože se v následujících měřeních bude pracovat s oběma částmi sondy dohromady, změřilo se i emisní spektrum pro **RhB1** při excitaci vlnovou délkou 425 nm používanou pro excitaci DEAC. Zjistili jsme, že rhodamin lze excitovat i touto vlnovou délkou, ale intenzita fluorescence je tak nízká, že by nemělo docházet k nežádané interferenci.



Graf 4: Emisní spektrum molekuly **RhB1** při excitaci vlnovou délkou 425 nm.

5.2 Fotostabilita

Protože se při detekčních měření H_2O_2 nebo trypsinu bude pozorovat změna fluorescenčních profilů fluoroforů, je potřeba zjistit, jestli jsou obě části sondy fotostabilní v čase, případně jak moc se budou intenzity fluorescence měnit s časem. Stabilita se změřila v různých roztocích v určitých časových intervalech.

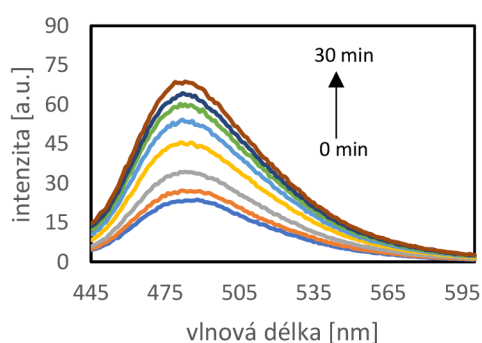
5.2.1 První část sondy – molekula E

Jako první se zjišťovala stabilita v TRIS pufru (Graf 5A). I přesto, že jsme věděli, že první část sondy **E** je špatně rozpustná v samotném TRIS pufru, chtěli jsme mít tyto data naměřené. Vzorek byl připraven částečným rozpuštěním v TRIS a poté alespoň pěti minutovým ošetřením v ultrazvukové lázni. Měřilo se za laboratorní teploty. Na spektru je viditelný pouze pík odpovídající DEAC, fluorescein v roztoku TRIS nebyl excitován

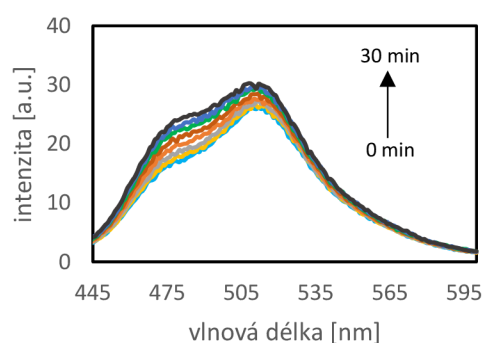
vlnovou délkou 425 nm. Dále je pozorovatelná velká změna intenzity v čase 30 minut, téměř trojnásobná, která je nejspíše zapříčiněna pevnými částčkami sloučeniny **E** v kyvetě, protože roztok nebyl zcela homogenní. Samotný TRIS pufr se pro naše měření stal nevyhovujícím ze třech důvodů, za prvé špatná rozpustnost sloučeniny **E**, za druhé vysoká nestabilita fluorescenční odezvy při měření, pravděpodobně způsobena špatnou rozpustností, a nakonec není viditelný pík odpovídající fluoresceinu, a tedy nemůže být pozorován FRET.

Proto jsme pro další měření použili pomocné rozpouštědlo DMSO. Na Grafu 5B můžeme vidět emisní spektrum při excitaci 425 nm 5% roztoku látky **E** v DMSO/TRIS (V/V). Na spektru jsou viditelné píky odpovídající jak DEAC, tak fluoresceinu, a tudíž zde může být pozorovatelný FRET. Oproti čistému TRIS je roztok stabilnější v čase, intenzita maxima pro DEAC (480 nm) narostla přibližně o 40 % a intenzita maxima fluoresceinu (515 nm) o 12 %.

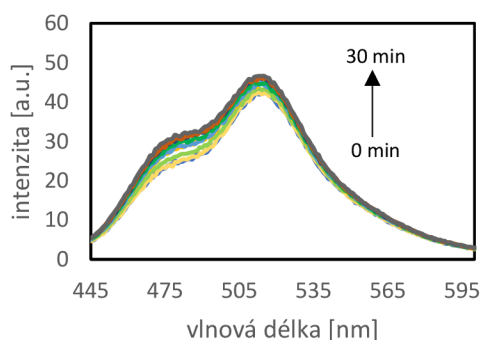
A TRIS



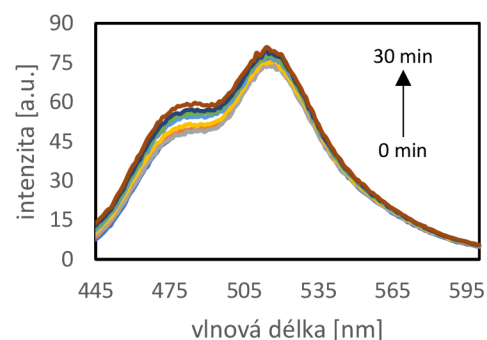
B 5% DMSO/TRIS



C 10% DMSO/TRIS



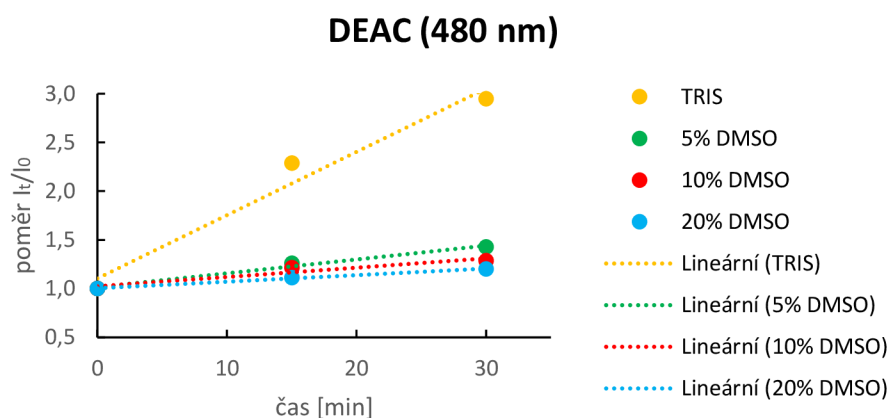
D 20% DMSO/TRIS



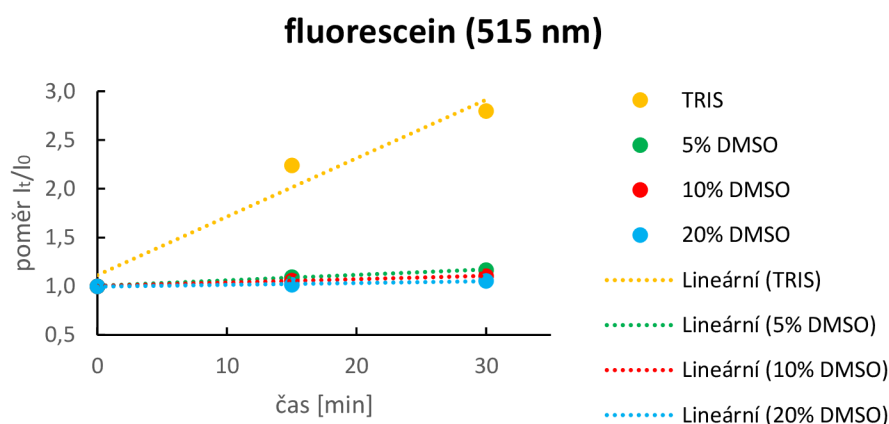
Graf 5: Emisní spektra molekuly **E** (10 μ M) při excitaci 425 nm, měřeno v čase 0–30 min.

Dále jsme zvýšili podíl pomocného rozpouštědla na 10% a 20% DMSO/TRIS (V/V) (Grafy 5C a 5D). Na obou spektrech jsou pozorovatelné píky DEAC i fluoresceinu a změna intenzity v čase je opět podstatně nižší než v případě čistého TRIS pufru. U 10% DMSO/TRIS byl nárůst intenzity v maximu pro DEAC necelých 30 % a pro fluorescein 10 %. V roztoku 20% DMSO/TRIS byly výsledky ještě lepší, pro DEAC 20 % a pro fluorescein do 6 %. Na Grafech 6 a 7 máme znázorněno, jak se mění poměr intenzity fluorescence v čase 0 min k intenzitě v čase t s časem. Na grafech je patrný trend, který naznačuje, že vyšší obsah organického rozpouštědla znamená větší stabilitu roztoku **E**.

Nakonec jsme zvolili roztok 10% DMSO v TRIS pufru pro další experimenty. U 20% DMSO/TRIS jsme totiž měli obavy, že nám nebude fungovat enzymatické měření, a u 5% DMSO/TRIS jsme si nebyli jistí ohledně homogenity roztoku **E**.



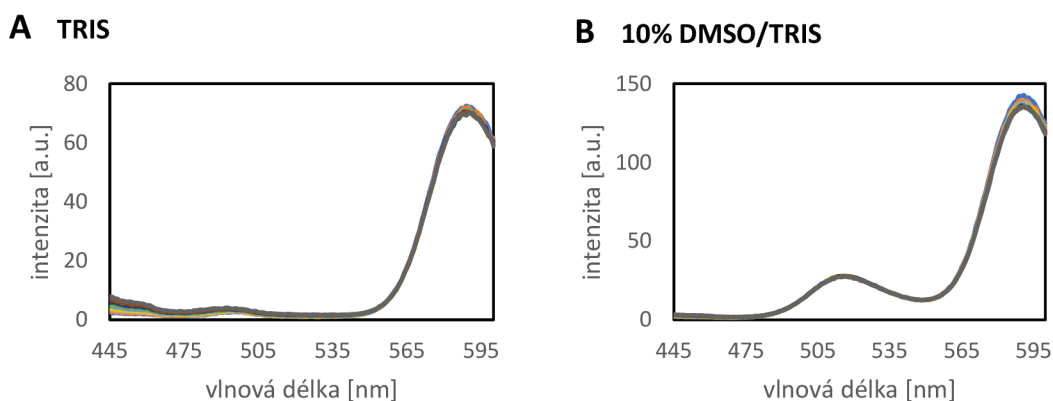
Graf 6: Změny poměru I_t/I_0 v časech 0, 15 a 30 min pro DEAC (480 nm) pro látku **E**.



Graf 7: Změny poměru I_t/I_0 v časech 0, 15 a 30 min pro fluorescein (515 nm) pro látku **E**.

5.2.2 Druhá část sondy – molekula RhB1

Ověřila se stabilita druhé části sondy molekuly **RhB1** s navázaným rhodaminovým barvivem v roztocích TRIS pufru a 10% DMSO v TRIS. Rozpustnost v samotném TRIS byla dobrá oproti první části **E**. Na obou spektrech vidíme rhodaminový pík s maximem přibližně 590 nm. Zajímavé je, že spektrum naměřené v 10% DMSO/TRIS navíc ukazuje i pík s maximem 515 nm. V průběhu 30 min bylo měření stabilní jak v TRIS (Graf 8A), tak v 10% DMSO/TRIS (Graf 8B).



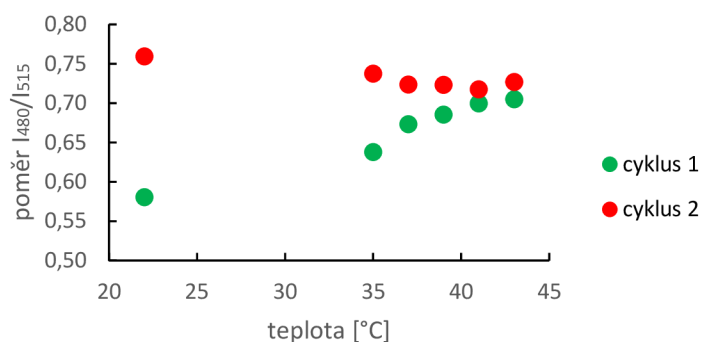
Graf 8: Emisní spektra **RhB1** (10 μ M) při excitaci 425 nm, měřeno v čase 0–30 min.

5.3 Teplotní závislost

Další závislost, kterou jsme chtěli ověřit, je vliv teploty první části sondy **E** na její fluorescenční stabilitu. Experiment jsme nastavili tak, že se měřil jeden vzorek při různých teplotách s časovými intervaly 10 minut pro teplotu na zvolenou teplotu. Připravený roztok molekuly **E** (10 μ M) v 10% DMSO/TRIS pufru se přefiltroval do kyvety a při laboratorní teplotě se změřilo emisní spektrum při excitaci 425 nm. Poté se změřily spektra při 35, 37, 39, 41 a 43 $^{\circ}$ C, a tím se uzavřel první cyklus měření. Vzorek se nechal vychládnout na pokojovou teplotu a znovu se měřily emisní spektra stejným způsobem v druhém cyklu.

V Grafu 9 jsou pak vyneseny poměry intenzit v maximu DEAC (480 nm) k maximu fluoresceinu (515 nm) v závislosti na teplotě. Na grafu je patrné, že při měřeních za vyšších teplot jsou rozdíly v poměrech intenzit nejmenší. Dalo by se tedy říct, že roztok **E** je stabilnější za vyšších teplot.

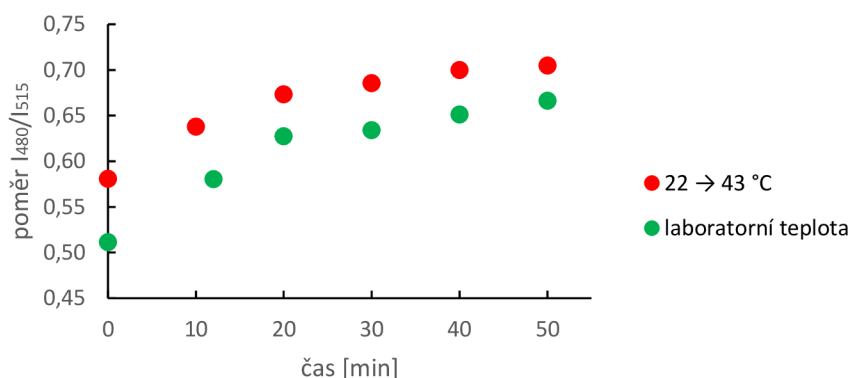
Závislost poměru I_{480}/I_{515} na teplotě



Graf 9: Vzorek látky E (10 μ M) v 10% DMSO/TRIS měřen při 22, 35, 37, 39, 41 a 43 °C ve dvou cyklech.

Graf 10 zobrazuje závislost poměru I_{480}/I_{515} na změně času. Zelené značky odpovídají roztoku, který byl po celou dobu experimentu (50 min) měřen za laboratorní teploty. Červené značky zobrazují vzorek, u kterého se každých 10 minut zvýšila teplota (22, 35, 37, 39, 41 °C), což odpovídá prvnímu cyklu měření, který byl zmíněný výše. Zde výsledky nejsou zcela jednoznačné. V čase 0 min tedy při stejné teplotě 22 °C je u obou měření rozdíl poměru intenzit asi 14 %. Dále s postupem času se červený bod (odpovídající 43 °C) a zelený bod v 50. minutě liší už jen o necelých 5 %. Tudiž se zdá, že roztok není až tak závislý na teplotě, jak spíš na čase měření. Ze stabilitních spekter tak máme data, která dokazují, že se intenzita fluorescence s časem měření zvyšuje.

Závislost poměru I_{480}/I_{515} na čase



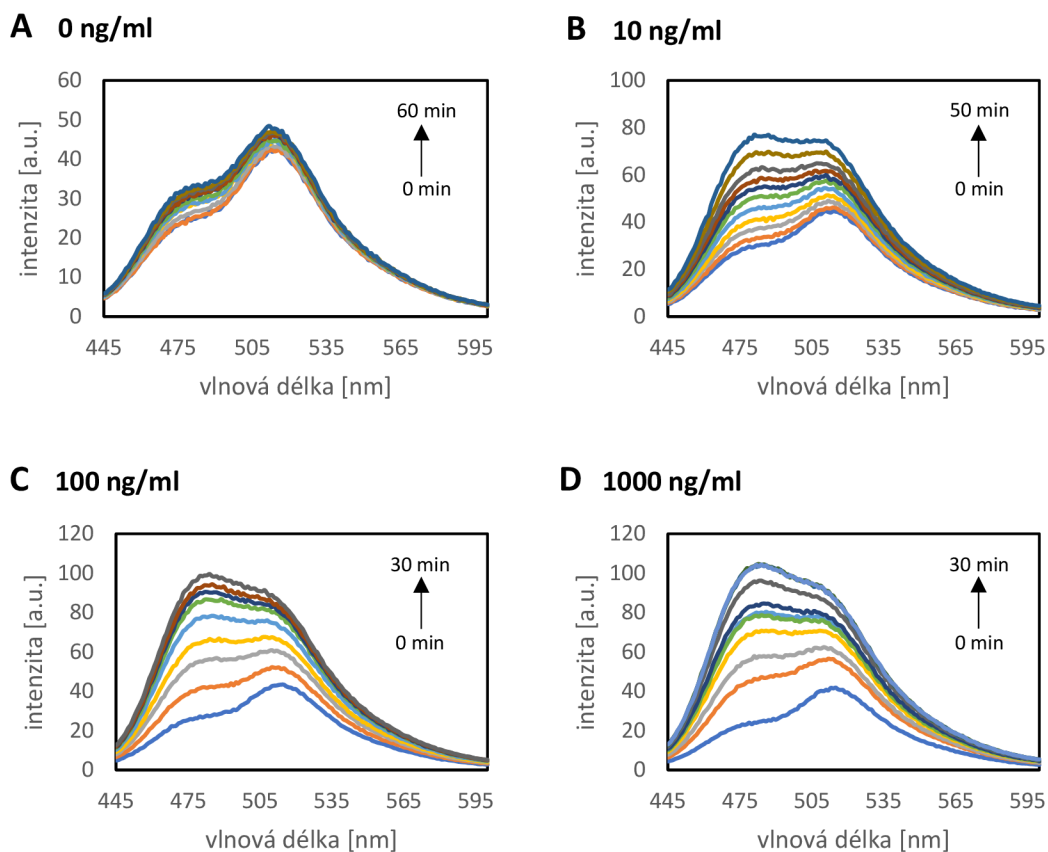
Graf 10: Vzorek látky E (10 μ M) v 10% DMSO/TRIS měřen za laboratorní teploty a se zvyšující se teplotou 50 minut.

5.4 Odezva na přítomnost trypsinu

Při enzymatickém měření jsme pracovali pouze s první částí sondy **E** v koncentraci 10 μM v roztoku 10% DMSO v TRIS pufru. Nejdříve se změřila stabilita sondy **E** bez trypsinu. Při měření enzymatického štípání se po vytemperování vzorku změřil blank, a poté se přidalo vždy 10 μl trypsinu o koncentraci 10, 100 a nakonec 1000 ng celkově v objemu 1 ml. Všechna naměřená spektra jsou uvedena na Grafech 11A–D.

Stabilita sondy **E** bez enzymu se měřila 1 hodinu a pozorovali jsme pomalé zvyšování intenzit obou maxim DEAC (480 nm) i fluoresceinu (515 nm). Při přidavku 10 ng trypsinu převýšila intenzita píku DEAC (480 nm) intenzitu píku fluoresceinu (515 nm) do 50 minut, což se bez enzymu nedělo. To znamená, že už při koncentraci 10 ng enzymu je patrné, že dochází k přerušení FRET mezi fluorofory. Peptidový řetězec molekuly **E** je postupně štěpen trypsinem, a tudíž nedochází k přenosu energie na fluorescein a intenzita fluorescence DEAC narůstá. Teoreticky by intenzita fluorescence fluoresceinu měla klesat, jak je štěpena molekula **E**, avšak v našem případě intenzity obou píků (480 a 515 nm) rostou samy o sobě s časem, tudíž k žádnému poklesu fluorescence dojít ani nemůže.

Pokud jsme vzali desetinasobnou koncentraci trypsinu, tak už ve 12. minutě intenzita píku DEAC převýšila intenzitu fluoresceinu, a se stonásobnou koncentrací, tedy 1000 ng/1 ml, se tak stalo už během prvních tří minut enzymatické reakce.

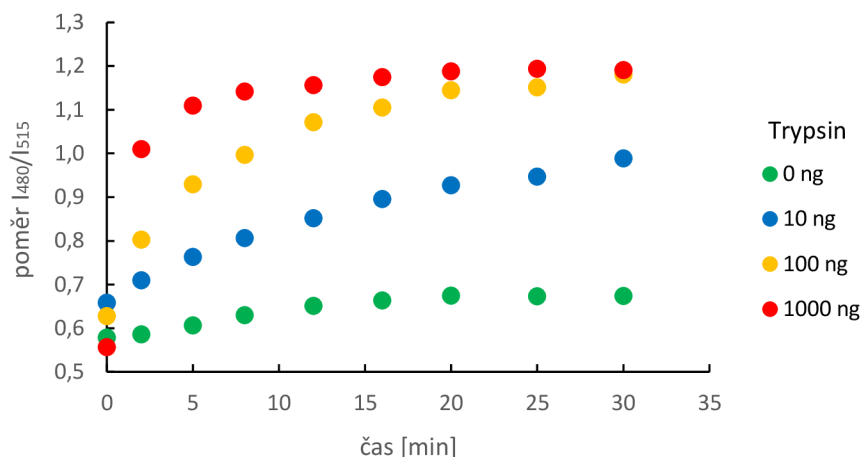


Graf 11: Emisní spektra sondy E ($10 \mu\text{M}$) v 10% DMSO/TRIS při 37°C s různými koncentracemi trypsinu při excitaci 425 nm.

Výsledky měření jsou vyhodnoceny na Grafu 12. Vynesli jsme do grafu poměr intenzit v maximu 480 nm (DEAC) ku maximu 515 nm (fluorescein) v závislosti na čase. Z grafu je zcela zřejmé, že v přítomnosti trypsinu dochází k přerušení FRET mezi DEAC a fluoresceinem, a tím pádem strmě narůstá intenzita DEAC.

Těmito experimenty jsme ověřili funkčnost sondy a potvrdili, že sonda E může být využita pro detekci trypsinu, kdy změny ve fluorescenčním profilu jsou patrné už při koncentraci 10 ng/ml.

Závislost poměru I_{480}/I_{515} na čase

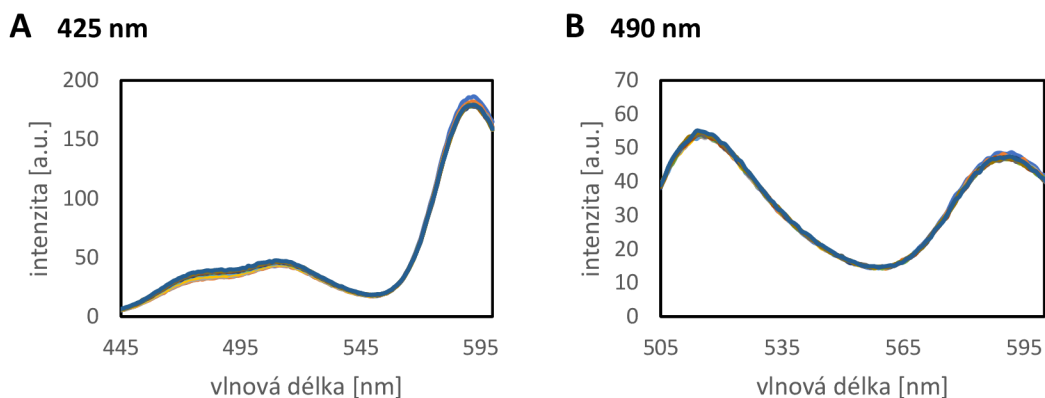


Graf 12: Závislost poměru I_{480}/I_{515} na čase (0–30 min) v případě koncentrace trypsinu 0, 10, 100 a 1000 ng v 1 ml.

5.5 Odezva na přítomnost peroxidu vodíku

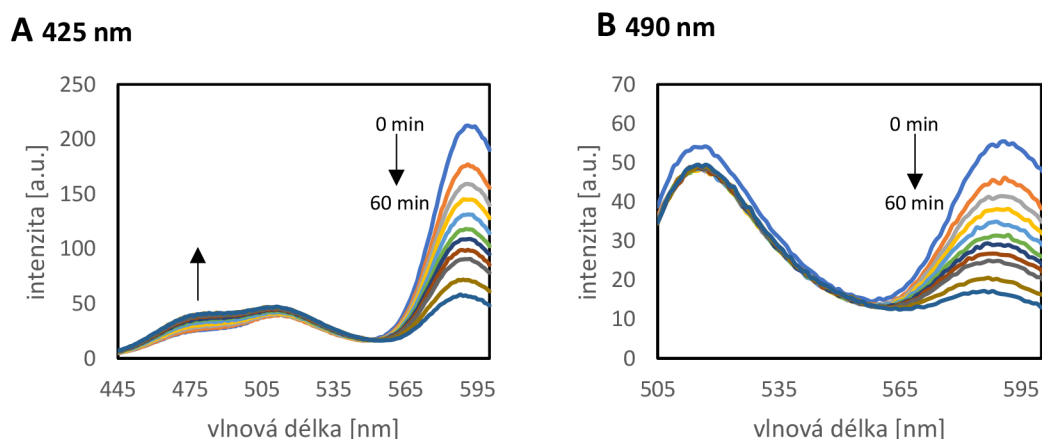
Nakonec jsme ověřovali funkčnost sondy **E/RhB1** pro hetero Diels-Alderovu cyklizaci. V kapitole 5.4 jsme dokázali, že dochází k tvorbě oxazinového kruhu pouze v přítomnosti H_2O_2 bez potřeby katalyzátoru. Doufali jsme tedy, že i s naší kompletní sondou **E/RhB1** budeme mít v tomto ohledu úspěch.

Prvním úkolem bylo ověřit, zda jsou obě části sondy **E/RhB1** vůči sobě inertní a neinteragují spolu navzájem. Byl připraven roztok sloučenin **E** a **RhB1** o koncentracích $10 \mu M$ v 10% DMSO/TRIS. Stabilita sondy **E/RhB1** se měřila 1 hodinu při $37^\circ C$ a spektra nevykazovala žádné extrémní výkyvy (Grafy 13A-B). V emisním spektru při excitaci 425 nm (Graf 13A) dochází opět k nárůstu intenzit píků DEAC (20 %) a fluoresceinu (8 %). Avšak tento nárůst je normální u první části sondy **E**, jak jsme si ověřili v kapitole 6.2. Lze tedy říct, že části **E** a **RhB1** spolu neinteragují a v rámci mezi je jejich spektrum stabilní.



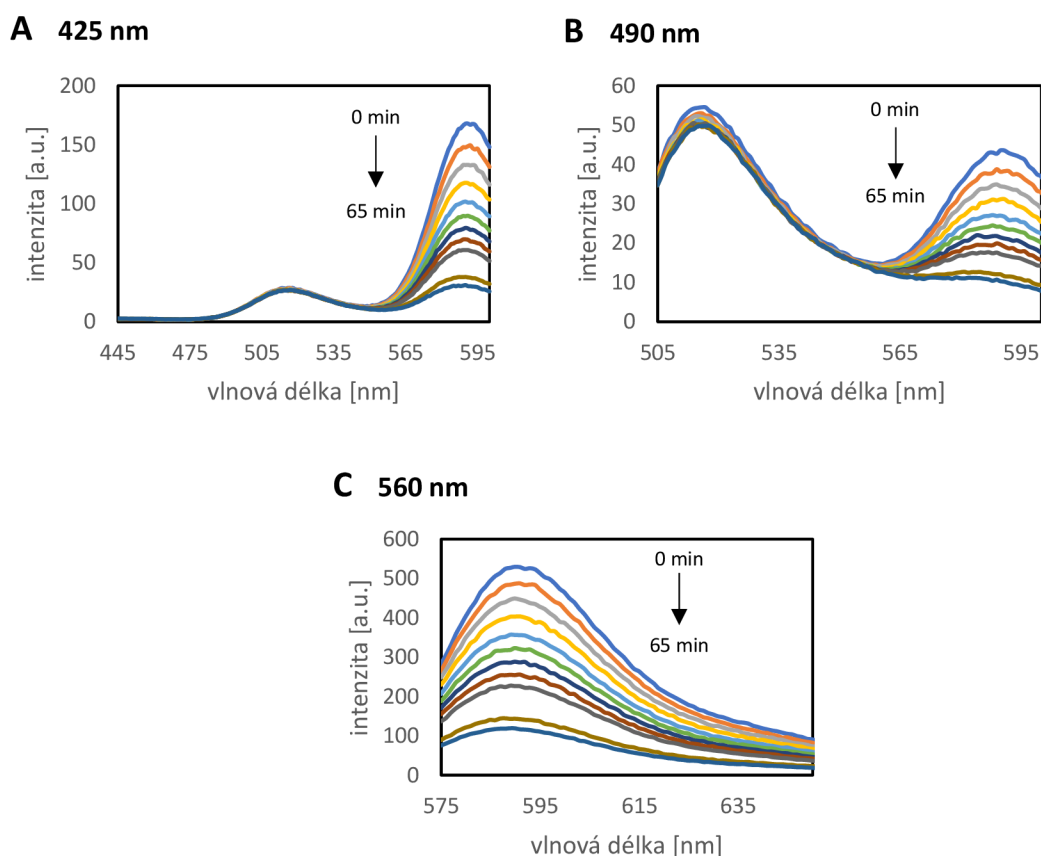
Graf 13: Emisní spektra stability sondy **E/RhB1** (10 μM) v 10% DMSO/TRIS, 60 min.

Dalším krokem bylo přidání H_2O_2 a pozorování, zda budeme pozorovat předpokládaný FRET 2 mezi fluoresceinem a rhodaminem, což by znamenalo, že na spektru by píky odpovídající DEAC (480 nm) a fluoresceinu (515 nm) klesaly v čase a intenzita píky rhodaminu (590 nm) by v čase naopak stoupala. Do roztoku sondy **E/RhB1** (10 μM) se po změření blanku přidalo 50 μl 33% H_2O_2 (0,54 M) a sledovali jsme změnu spekter opět 60 minut. Na Grafech 14A a 14B můžeme zřetelně vidět, jak dochází ke snižování intenzity píky rhodaminu (590 nm) na skoro $\frac{1}{4}$ intenzity blanku. Píky DEAC (480 nm) a fluoresceinu (515 nm) se opět zvyšují, DEAC přibližně o 50 % a fluorescein o 15 %. Takové chování jsme nepředpokládali, a proto jsme veškerou pozornost zaměřili na rozklíčování záhady, proč dochází ke snižování intenzity rhodaminu v přítomnosti H_2O_2 místo toho, aby se jeho intenzita zvyšovala.



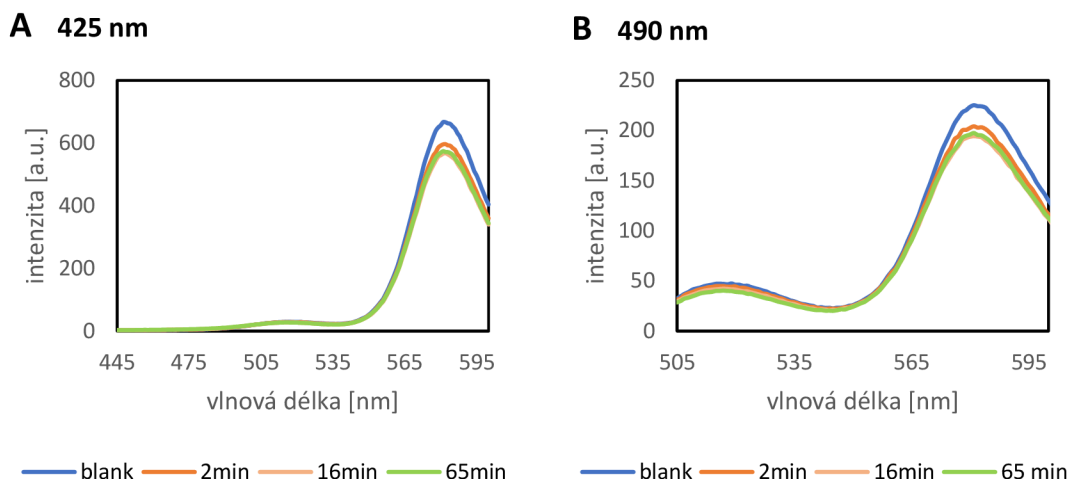
Graf 14: Emisní spektra sondy **E/RhB1** (10 μM) v 10% DMSO/TRIS s přidavkem 50 μl 33% H_2O_2 , měřeno 60 min.

Zaměřili jsme proto naši pozornost pouze na druhou část sondy, tedy molekulu **RhB1**. Z kapitoly 6.2 už víme, že **RhB1** je stabilní v čistém roztoku TRIS i v 10% DMSO/TRIS. Změřili jsme tedy roztok **RhB1** (10 μM) v 10% DMSO/TRIS s přidavkem 50 μl 33 % H_2O_2 . Ukázalo se, že samotná druhá část **RhB1** reflektuje přítomnost H_2O_2 , protože intenzita rhodaminu (590 nm) opět klesala s časem (Grafy 15A-C). Předpokládali jsme, že molekula **RhB1** reaguje s H_2O_2 a v důsledku toho rhodaminová část ztrácí schopnost fluorescence.



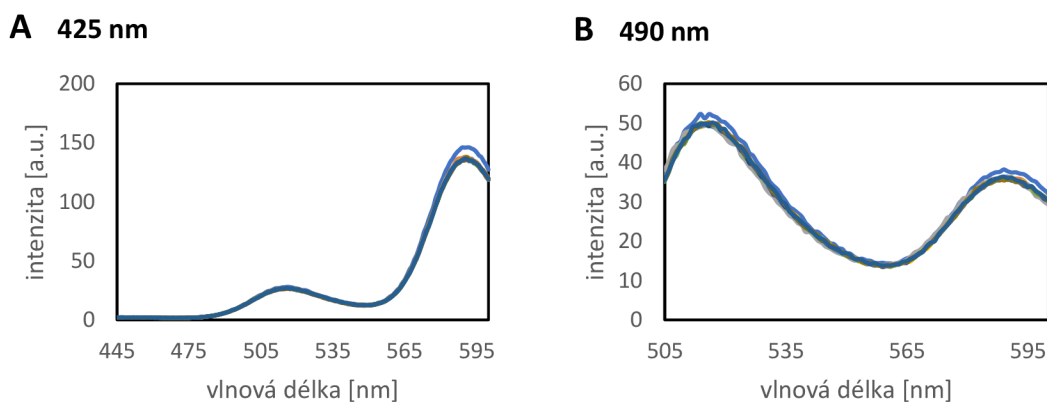
Graf 15: Emisní spektra molekuly **RhB1** (10 μM) v 10% DMSO/TRIS s přidavkem 50 μl 33% H_2O_2 , měřeno 65 min.

Proto bylo navrženo proměřit stabilitu samotného barviva rhodaminu B v 10% DMSO/TRIS s přidavkem 50 μl 33% H_2O_2 . Výsledek můžeme vidět na Grafech 16A-B, kdy samotné barvivo rhodamin B s H_2O_2 nereaguje. Skokový rozdíl blanku a dalších měření s H_2O_2 je pravděpodobně způsoben tím, že roztok nebyl dostatečnou dobu temperován na 37 $^{\circ}\text{C}$, a v měřeních je nejspíš malý teplotní rozdíl, který hraje roli v intenzitě fluorescence.



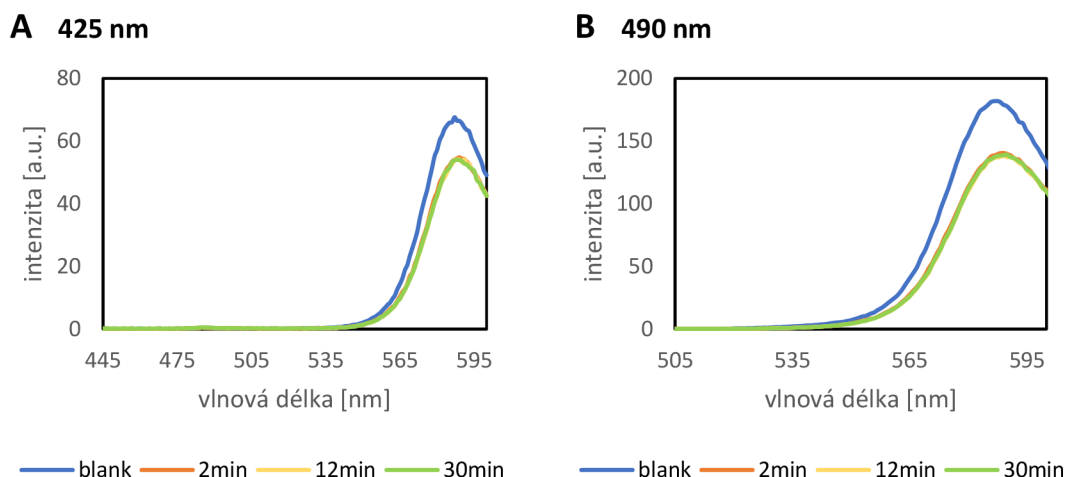
Graf 16: Emisní spektra sloučeniny rhodaminu B ($10 \mu\text{M}$) v 10% DMSO/TRIS s přídavkem $50 \mu\text{l}$ 33% H_2O_2 , měřeno 65 min.

Dále jsme chtěli ověřit, zda ve změně intenzity nehraje roli zředění roztoku **RhB1** další látkou. Proto jsme k roztoku **RhB1** v 10% DMSO/TRIS přidali místo $50 \mu\text{l}$ H_2O_2 pouze vodu. Na spektrech (Grafy 17A-B) můžeme vidět zcela stabilní roztok po 1 hodinu.



Graf 17: Emisní spektra molekuly **RhB1** ($10 \mu\text{M}$) v 10% DMSO/TRIS s přídavkem $50 \mu\text{l}$ H_2O , měřeno 60 min.

Na modelovém systému pro zkušební hetero Diels-Alderovu reakci (viz. kapitola 5.4), kde rozpouštědlem byl EtOH, jsme nezaznamenali žádný problém v reakci. Proto jsme zkusili experiment provést v EtOH vytemperovaném na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Na Grafech 18A-B vidíme, že roztok **RhB1** je stabilní s přídavkem H_2O_2 . Akorát se tu opět projevila teplotní závislost, u všech měření s H_2O_2 jsme zaznamenaly pokles intenzity oproti změření blanku.

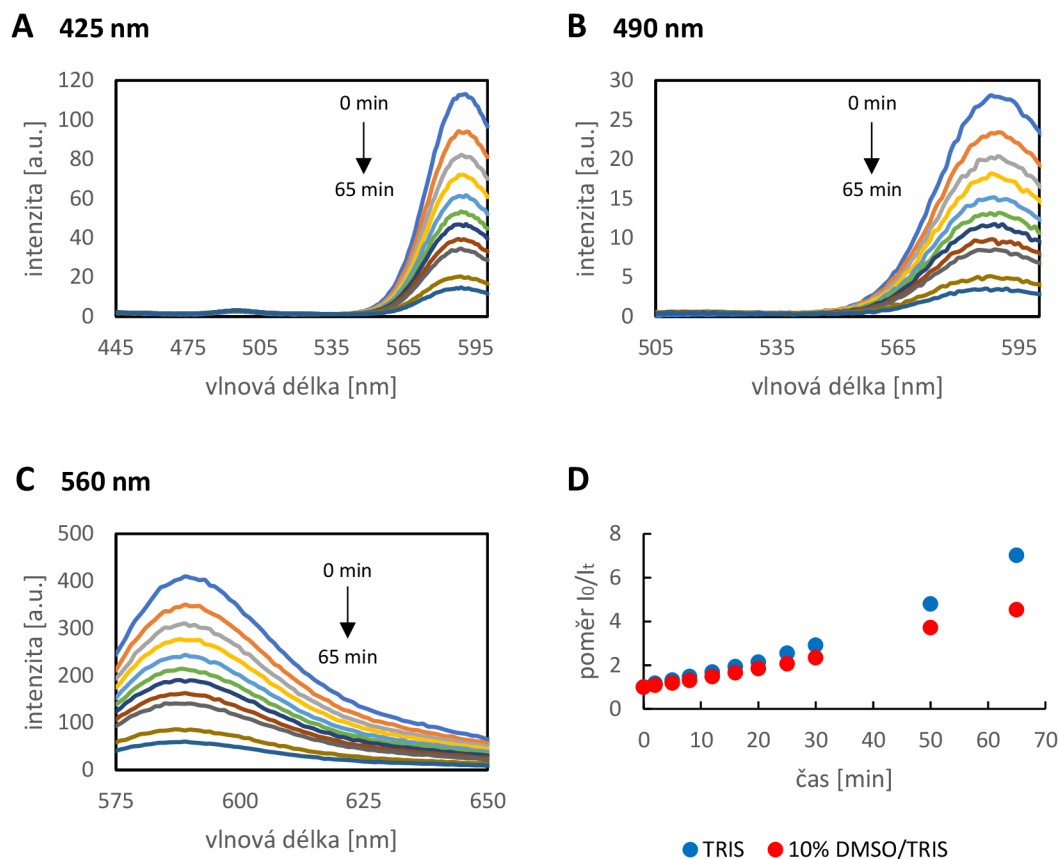


Graf 18: Emisní spektra molekuly **RhB1** (10 μM) v EtOH s přidavkem 50 μl 33% H_2O_2 , měřeno 30 min.

Pokud je molekula **RhB1** stabilní v EtOH v přítomnosti H_2O_2 , naopak v čistém TRIS a v 10% DMSO/TRIS pouze bez peroxidu, a víme, že samotná látka rhodamin B s H_2O_2 nijak nereaguje, pak reaktivita **RhB1** s peroxidem musí být způsobena buď TRIS pufrem nebo pomocným rozpouštědlem DMSO.

Posledním experimentem bylo proměření roztoku **RhB1** s přidavkem H_2O_2 v čistém TRIS pufru. Došlo téměř k desetinásobnému poklesu intenzity fluorescence za 65 minut (Grafy 19A-C). Výsledek tedy ukázal, že reakce **RhB1** s H_2O_2 je způsobena pouze TRIS pufrem. Dále jsme na Grafu 19D srovnali rychlost reaktivity **RhB1** s H_2O_2 v TRIS a v 10% DMSO/TRIS. V čistém TRIS pufru je pokles intenzity rhodaminového píku (590 nm) rychlejší, než je tomu tak v 10% DMSO/TRIS.

Kolega MSc. David Miličević, Ph.D. se podrobněji zajímal o osud sloučeniny **RhB1** v přítomnosti H_2O_2 v roztoku TRIS pufru a podle analýz z LC/MS zjistil, že dochází k úplnému rozložení rhodaminové části molekuly, a tím pádem ke ztrátě fluorescenčního signálu.



Graf 19: (A-C) Emisní spektra molekuly **RhB1** (10 μM) v TRIS pufru s přidavkem 50 μl 33% H_2O_2 , měřeno 65 min. (D) Závislost poměru I_0/I_t na čase v TRIS a v 10% DMSO/TRIS při excitaci 560 nm.

Shrneme-li si to, tak změřením fluorescence jsme zjistili, že sonda **E/RhB1** nereflektuje H_2O_2 předpokládaným způsobem. Proto jsme se zabývali druhou částí sondy molekulou **RhB1** a zjistili jsme, že molekula **RhB1** reflektuje H_2O_2 , ale samotné barvivo rhodamin B s H_2O_2 nereaguje. V rozpouštědle EtOH opět nedošlo k žádné reakci molekuly **RhB1** s H_2O_2 , a proto se měřilo v čistém TRIS, což nám dalo reakci pozitivní. Tudíž pomocí všech provedených experimentů jsme zjistili, že peroxid vodíku reaguje pouze s molekulou **RhB1**, nikoliv se samotným rhodaminem B, který tvoří jeho základ, a že k reakci je nutná přítomnost TRIS pufru.

Experimentální část

6. Přístrojové vybavení a metody

LC/MS analýzy byly provedeny na UHPLC-MS systému značky Waters složeného z UHPLC chromatografu Acquity s PDA detektorem a hmotnostního spektrometru s jednoduchým kvadrupólem (Waters). Byla použita kolona XSelectR HSS T3 2.5 μ m při 30 °C a rychlosti průtoku 600 μ l/min. Složení mobilní fáze bylo následující – (A) 10 mM octan amonný ve vodě a (B) acetonitril : voda (90 : 10). Metoda 1 (normal): lineárně naprogramovaná od 22 do 88 % B po 4,5 minuty, udržováno po dobu 0,5 minuty. Dále lineárně naprogramovaná zpět od 88 po 22 % B po 5,5. minutu. Kolona byla reekvilibrována pomocí 22% roztoku B po dobu 2 minut. Metoda 2 (slow): od počátku po 1. minutu udržováno 5,5 % B, lineárně naprogramovaná od 5,5 do 66 % B po 5. minutu, dále lineárně naprogramovaná zpět od 66 do 5,5 % B po 5,5. minutu. Kolona byla reekvilibrována pomocí 5,5% roztoku B po dobu 2 minut.

Získaný produkt **E** byl přečištěn za využití semipreparativní HPLC Waters 1500 vybavené autosamplerem 2707, a binární HPLC pumpou 1525, Waters PDA detektorem 2998 a Waters frakčním kolektorem III spolu s YMC C18 kolonou naplněnou reverzní fází, 20 \times 100 mm, s 5 μ m částicemi.

Jako počáteční mobilní fáze byla použita směs (A) 30 % čistého acetonitrilu a (B) 70% 10 mM roztoku octanu amonného. Gradient byl 30-75-90 složky (A) trvajících 10,5 minut s průtokem 15 ml/min. Reekvilibrace kolony trvala 1 minutu.

Fluorescence byla měřena fluorescenčním spektrofotometrem Varian Cary Eclipse vybavené termostatem (FL1009M015). Emisní spektra při excitaci 425 nm byla měřena se štěrbinou 10 nm, při excitaci 490 nm a 560 nm se štěrbinou 5 nm, pokud není řečeno jinak.

7. Příprava sond

7.1 Příprava vzorků pro LC/MS analýzu

Analytické množství vzorku se odštěpilo z pryskyřice působením 50% TFA/DCM (V/V) po dobu 15 minut. Roztok byl odpařen pod proudem dusíku a odparek poté rozpuštěn ve směsi 50% acetonitril/voda (V/V) a vzniklý roztok podroben LC/MS analýze.

7.2 Příprava sloučenin dle Schématu 2

V této kapitole jsou uvedeny postupy přípravy pro jednotlivé reakční kroky uvedené ve Schématu 2 a Tabulce 2.

Odstranění chránící Fmoc skupiny (reakční podmínky i)

Chránící Fmoc skupina se deprotekovala 50% roztokem piperidinu v DMF (V/V) 15 minut. Poté se roztok promyl 3×DMF, 3×DCM.

Navázání aminokyselin (kroky ii, iii, iv, v-a,b)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,3M roztok aminokyseliny, HOBt (0,175 g) a DIC (0,185 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 1 hodinu, následně promyta 3×DMF, 3×DCM.

Navázání aminokyselin (kroky vi, viii) a PEG (krok vii)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok aminokyseliny/PEG, HOBt (0,118 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 1 hodinu, následně promyta 3×DMF, 3×DCM.

Navázání barviva DEAC (krok ix)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok DEAC (0,209 g), HOBt (0,118 g), DMAP (0,098 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMSO/DCM/DMF (2:2:1, V/V/V). Roztok se nechal 16 hodin třepat za laboratorní teploty. Poté se reakční směs odstranila a pryskyřice promyla 10×DMF a 10×DCM.

Charakterizace látek ve Schématu 2

Intermediát 3A: LC/MS: metoda 1; $R_t = 2,91$ min; čistota 86 %; m/z pro $C_{43}H_{60}N_7O_8$ vypočteno 802,45 $[M + H]^+$, nalezeno 802,50.

Intermediát 3B: LC/MS: metoda 1; $R_t = 3,96$ min; čistota 97 %; m/z pro $C_{46}H_{57}N_6O_8$ vypočteno 821,43 $[M + H]^+$, nalezeno 821,06.

Intermediát 4A: LC/MS: metoda 1; $R_t = 2,65$ min; čistota 92 %; m/z pro $C_{48}H_{73}N_{10}O_{11}$ vypočteno 965,55 $[M + H]^+$, nalezeno 965,61.

Intermediát 4B: LC/MS: metoda 1; $R_t = 2,99$ min; čistota 94 %; m/z pro $C_{51}H_{70}N_9O_{11}$ vypočteno 984,52 $[M + H]^+$, nalezeno 984,59.

Intermediát 4C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 2,44$ min; čistota 90 %; m/z pro $C_{54}H_{84}N_{11}O_{14}$ vypočteno 1110,62 $[M + H]^+$, nalezeno 1110,62.

Intermediát 4D: LC/MS: metoda 1; $R_t = 3,03$ min; čistota 89 %; m/z pro $C_{57}H_{81}N_{10}O_{14}$ vypočteno 1129,60 $[M + H]^+$, nalezeno 1129,57.

7.3 Příprava sloučenin dle Schématu 3

V této kapitole jsou uvedeny postupy přípravy pro jednotlivé reakční kroky uvedené ve Schématu 3 a Tabulce 4. Tato kapitola zahrnuje i postupy při deprotekčních reakcích chránící Dde skupiny uvedené v Tabulce 3.

Způsoby deprotekce Dde (Tabulka 3)

Způsoby deprotekce Dde chránící skupiny uváděné v kapitole 5.3.1. byly realizovány následovně.

První způsob – $NH_2OH.HCl$ (1,25 g) a imidazol (0,92 g) byly rozpuštěny v 10 ml NMP a 2 ml DCM a podrobeny reakci s pryskyřicí po dobu 1,5 hodiny za laboratorní teploty, poté se pryskyřice promyla 3×NMP, 3×DMF a 3×DCM.

Druhý způsob – $NH_2OH.HCl$ (0,63 g) a imidazol (0,43 g) byly rozpuštěny v 6 ml NMP a 4 ml DCM a podrobeny reakci s pryskyřicí 2 hodiny za laboratorní teploty, poté se pryskyřice promyla 3×NMP, 3×DMF a 3×DCM.

Třetí způsob byl identický jako druhý, akorát se reakční doba prodloužila na 3 hodiny.

Odstranění chránící Dde skupiny (reakční podmínky i, Schéma 3)

NH₂OH.HCl (0,63 g) a imidazol (0,43 g) byly rozpuštěny v 6 ml NMP a 4 ml DCM a reagovalo se s pryskyřicí 3 hodiny za laboratorní teploty, poté se pryskyřice promyla 3×NMP, 3×DMF a 3×DCM.

Navázání aminokyseliny a PEG (kroky ii, iv a v)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok aminokyseliny/PEG, HOBt (0,118 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 2 hodiny, následně promyta 3×DMF, 3×DCM.

Odstranění chránící Fmoc skupiny (krok iii)

Chránící Fmoc skupina byla deprotekována 50% roztokem piperidinu v DMF (V/V) 15 minut. Poté se roztok promyl 3×DMF, 3×DCM.

Navázání barviva fluorescein (krok vi)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok fluoresceinu (0,266 g), HOBt (0,118 g), DMAP (0,098 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 16 hodin, následně promyta 10×DMF, 10×DCM.

Charakterizace látek ve Schématu 3

Intermediát 6B: LC/MS: metoda 1; R_t = 2,66 min; čistota 78 %; m/z pro C₈₆H₁₀₉N₁₃O₂₀ vypočteno 822,44 [M + 2H]²⁺, nalezeno 822,08.

Intermediát 6C: LC/MS: metoda 1; R_t = 2,15 min; čistota 58 %; m/z pro C₈₃H₁₁₂N₁₄O₂₀ vypočteno 812,40 [M + 2H]²⁺, nalezeno 812,58.

7.4 Příprava sloučenin dle Schématu 4

V této kapitole jsou uvedeny postupy přípravy pro jednotlivé reakční kroky uvedené ve Schématu 4 a Tabulce 5.

Odstranění chránící Dde skupiny (reakční podmínky i)

NH₂OH.HCl (0,63 g) a imidazol (0,43 g) byly rozpuštěny v 6 ml NMP a 4 ml DCM a reagovalo se s pryskyřicí 3 hodiny za laboratorní teploty, poté se pryskyřice promyla 3×NMP, 3×DMF a 3×DCM.

Navázání Fmoc-Lys(Dde)-OH (krok ii)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok Fmoc-Lys(Dde)-OH (0,426 g), HOBt (0,118 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 1 hodinu, následně promyta 3×DMF, 3×DCM.

Odstranění chránící Fmoc skupiny (krok iii)

Chránící Fmoc skupina byla deprotekována 50% roztokem piperidinu v DMF (V/V) 15 minut. Poté se roztok promyl 3×DMF, 3×DCM.

Navázání 4-fluoro-3-nitrobenzoové kyseliny (krok iv)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,3M roztok 4-fluoro-3-nitrobenzoové kyseliny (0,222 g), HOBt (0,175 g) a DIC (0,185 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 7 hodin, následně promyta 5×DMF, 5×DCM.

Charakterizace látek ve Schématu 4

Intermediát 8C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 2,63$ min; čistota 93 %; m/z pro $C_{67}H_{99}FN_{14}O_{18}$ vypočteno 703,37 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 703,73.

7.5 Příprava sloučenin dle Schématu 5

V této kapitole jsou uvedeny postupy přípravy pro jednotlivé reakční kroky uvedené ve Schématu 5 a Tabulce 6.

Substituční reakce fluoru za hydroxylamin a zároveň deprotekční reakce chránící Dde skupiny (reakční podmínky i)

Pryskyřice se promyla 3×pyridinem a poté se nechala reagovat s 1M roztokem $NH_2OH.HCl$ (0,276 g) ve 4 ml pyridinu přes noc při pokojové teplotě. Pryskyřice byla promyta sekvencí 10×pyridin, 10×1% AcOH/DMF, 10×20% H_2O/DMF , 10×DMF, 10×DCM, 3×MeOH a poté zcela vysušena proudem dusíku.

Navázání Fmoc-Sar-OH (krok ii)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok Fmoc-Sar-OH (0,249 g), HOBt (0,118 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 2 hodiny, následně promyta 3×DMF, 3×DCM.

Odstranění chránicí Fmoc skupiny (krok iii)

Chránicí Fmoc skupina byla deprotekována 50% roztokem piperidinu v DMF (V/V) 15 minut. Poté se roztok promyl 3×DMF, 3×DCM.

Navázání barviva fluorescein (krok iv)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok fluoresceinu (0,266 g), HOBt (0,118 g), DMAP (0,098 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 16 hodin, následně promyta 10×DMF, 10×DCM.

Charakterizace látek ve Schématu 5

Intermediát 9C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 1,88$ min; čistota 92 %; m/z pro $C_{57}H_{89}N_{15}O_{17}$ vypočteno 627,83 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 628,06.

Intermediát 10C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 4,39$ min; čistota 80 %; m/z pro $C_{93}H_{119}N_{17}O_{23}$ vypočteno 921,44 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 921,32.

Intermediát 11C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 1,88$ min; čistota 65 %; m/z pro $C_{60}H_{94}N_{16}O_{18}$ vypočteno 663,35 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 663,57.

7.6 Příprava sloučenin dle Schématu 6 a 7

V této kapitole jsou uvedeny postupy pro jednotlivé reakční kroky přípravy stavebního bloku **16** (Schéma 6) a následné acylační reakce látky **16** s pryskyřicí **9C** (Schéma 7).

Navázání Fmoc-Sar-OH (Schéma 6)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok Fmoc-Sar-OH (0,249 g), HOBt (0,118 g), DIC (0,125 ml) a 0,05M DMAP (24,4 mg) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 1 hodinu, následně promyta 3×DMF, 3×DCM.

Odstranění chránicí Fmoc skupiny (Schéma 6)

Chránicí Fmoc skupina byla deprotekována 50% roztokem piperidinu v DMF (V/V) 15 minut. Poté se roztok promyl 3×DMF, 3×DCM.

Navázání barviva fluorescein (Schéma 6)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok fluoresceinu (0,266 g), HOBt (0,118 g), DMAP (0,098 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 23 hodin, následně promyta 10×DMF, 10×DCM.

Navázání stavebního bloku 16 (Schéma 7)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok látky **16** (0,161 g), HOBt (0,060 g) a DIC (0,063 ml) ve 2 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 4 hodiny, následně promyta 5×DMF, 5×DCM.

Charakterizace látek ve Schématu 6 a 7

Intermediát 16: LC/MS: metoda 2; $R_t = 3,10$ min; čistota 93 %; m/z pro $C_{23}H_{18}NO_6$ vypočteno 404,12 $[M + H]^+$, nalezeno 404,10.

7.7 Příprava sloučenin dle Schématu 9

V této kapitole jsou uvedeny postupy přípravy pro jednotlivé reakční kroky uvedené ve Schématu 9 a Tabulce 7.

Protekční reakce hydroxylaminu pomocí terc-butyldimethylsilyl chloridu (reakční podmínky i)

Pryskyřice se nechala reagovat s roztokem 0,3M TBDMSCl (45 mg) a 0,4M imidazolu (27 mg) v 1 ml suchého DMF 16 hodin při pokojové teplotě. Poté byla promyta 3 × DMF, 3 × DCM.

Navázání Fmoc-Sar-OH (krok ii)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok Fmoc-Sar-OH (0,249 g), HOBt (0,118 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 5 hodin, následně promyta 3×DMF, 3×DCM.

Odstranění chránící Fmoc skupiny (krok iii)

Chránící Fmoc skupina byla deprotekována 50% roztokem piperidinu v DMF (V/V) 30 minut. Poté se roztok promyl 3×DMF, 3×DCM.

Charakterizace látek ve Schématu 9

Intermediát 21C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 3,27$ min; čistota 24 %; m/z pro $C_{64}H_{103}N_{15}O_{18}Si$ vypočteno 698,87 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 699,19.

Intermediát 22C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 1,92$ min; čistota 60 %; m/z pro $C_{58}H_{89}N_{15}O_{18}$ vypočteno 641,83 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 642,07.

Intermediát 23C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 3,41$ min; čistota 64 %; m/z pro $C_{76}H_{104}N_{16}O_{21}$ vypočteno 788,38 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 788,52.

7.8 Příprava sloučenin dle Schématu 10

V této kapitole jsou uvedeny postupy přípravy pro jednotlivé reakční kroky uvedené ve Schématu 10 a Tabulce 8.

Protekční reakce hydroxylaminu pomocí terc-butyltrimethylsilyl chloridu (reakční podmínky i)

Pryskyřice se nechala reagovat s roztokem 0,3M TBDMSCl (45 mg) a 0,4M imidazolu (27 mg) v 1 ml suchého DCM/NMP (1:1, V/V) 16 hodin při pokojové teplotě. Poté byla promyta 3×DMF, 3×DCM.

Navázání Fmoc-Sar-OH (krok ii)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok Fmoc-Sar-OH (0,249 g), HOBt (0,118 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 3 hodiny, následně promyta 3×DMF, 3×DCM.

Odstranění chránící Fmoc skupiny (krok iii)

Chránící Fmoc skupina byla deprotektována 50% roztokem piperidinu v DMF (V/V) 30 minut. Poté se roztok promyl 3×DMF, 3×DCM.

Navázání barviva fluorescein (krok iv)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok fluoresceinu (0,266 g), HOBt (0,118 g), DMAP (0,098 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty přes noc, následně promyta 10×DMF, 10×DCM.

Charakterizace látek ve Schématu 9

Intermediát 10C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 4,39$ min; čistota 38 %; m/z pro $C_{93}H_{119}N_{17}O_{23}$ vypočteno 921,44 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 921,04.

Intermediát 11C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 1,88$ min; čistota 69 %; m/z pro $C_{60}H_{94}N_{16}O_{18}$ vypočteno 663,35 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 663,70.

7.9 Příprava sloučenin dle Schématu 12

V této kapitole jsou uvedeny postupy pro jednotlivé reakční kroky přípravy stavebního bloku **36** uvedené ve Schématu 12.

Navázání Fmoc-Ala-OH – příprava intermediátu 31

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,3M roztok Fmoc-Ala-OH (0,560 g), HOBt (0,260 g), DIC (0,278 ml) a DMAP (0,220 g) v 6 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty přes noc, následně promyta 3×DMF, 3×DCM.

Odstranění chránící Fmoc skupiny – příprava intermediátu 32

Chránící Fmoc skupina byla deprotekována 50% roztokem piperidinu v DMF (V/V) 15 minut. Poté se roztok promyl 3×DMF, 3×DCM.

Navázání 4-fluoro-3-nitrobenzoové kyseliny – příprava intermediátu 34

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,3M roztok 4-fluoro-3-nitrobenzoové kyseliny **33** (0,333 g), HOBt (0,260 g) a DIC (0,278 ml) ve 6 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty přes noc, následně promyta 5×DMF, 5×DCM.

Substituční reakce fluoru za hydroxylamin – příprava intermediátu 35

Pryskyřice se promyla 3×pyridinem a poté se nechala reagovat s 1M roztokem $NH_2OH.HCl$ (0,414 g) v 6 ml pyridinu přes noc při pokojové teplotě. Pryskyřice byla promyta sekvencí 10×pyridin, 10×1% AcOH/DMF, 10×20% H_2O/DMF , 10×DMF, 10×DCM, 3×MeOH, poté zcela vysušena proudem dusíku a nakonec byla pryskyřice dána na lyofilizátor přes noc.

Charakterizace látek ve Schématu 11

Intermediát 35: LC/MS: metoda 2; $R_t = 0,54$ min; čistota 80 %; m/z pro $C_{10}H_{10}N_3O_6$ vypočteno 268,05 $[M - H]^-$, nalezeno 267,97.

7.10 Příprava sloučenin dle Schématu 13

V této kapitole jsou uvedeny postupy přípravy pro jednotlivé reakční kroky uvedené ve Schématu 13 a Tabulce 9.

Odstranění chránicí Dde skupiny (reakční podmínky i)

$NH_2OH.HCl$ (0,63 g) a imidazol (0,43 g) byly rozpuštěny v 6 ml NMP a 4 ml DCM a reagovalo se s pryskyřicí 3 hodiny za laboratorní teploty, poté se pryskyřice promyla $3 \times NMP$, $3 \times DMF$ a $3 \times DCM$.

Navázání Fmoc-Lys(Mtt)-OH a Fmoc-Sar-OH (kroky ii, iv)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok Fmoc-Lys(Mtt)-OH (0,500 g) nebo Fmoc-Sar-OH (0,250 g), HOBt (0,118 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 2 hodiny, následně promyta $3 \times DMF$, $3 \times DCM$.

Odstranění chránicí Fmoc skupiny (krok iii)

Chránicí Fmoc skupina byla deprotekována 50% roztokem piperidinu v DMF (V/V) 15 minut. Poté se roztok promyl $3 \times DMF$, $3 \times DCM$.

Navázání barviva fluorescein (krok v)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok fluoresceinu (0,266 g), HOBt (0,118 g), DMAP (0,098 g) a DIC (0,125 ml) ve 4 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 16 hodin, následně promyta $10 \times DMF$, $10 \times DCM$.

Odstranění chránicí Mtt skupiny (krok vi)

Zde bylo potřeba pryskyřici převést z plastové injekční stříkačky s filtrem do kulaté baňky. Reakční roztok byl připraven smícháním 0,4 ml triethylsilanu, 0,2 ml hexafluoro-2-propanolu, 0,1 ml 2,2,2-trifluoroethanolu a 1,3 ml 1,2-dichloroethanu. Reakce se prováděla 3,5 hodiny pod refluxem při 60 °C na magnetické míchačce (max 130 otáček).

Po deprotekční reakci se pryskyřice opatrně přesunula zpět do nové stříkačky s filtrem a promyla se 5×DCM.

Navázání stavebního bloku 36 (krok vii)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok látky **36** (54 mg), HOBt (30 mg) a DIC (0,031 ml) v 1 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 3 hodiny, následně promyta 10×DMF, 10×DCM. Reakce se pak zopakovala dalších 17 hodin při 40 °C a pryskyřice se opět promyla 10×DMF, 10×DCM.

Charakterizace látek ve Schématu 13

Intermediát 37C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 2,70$ min; čistota 86 %; m/z pro $C_{65}H_{95}N_{13}O_{15}$ vypočteno 648,86 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 649,23.

Intermediát 39C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 1,93$ min; čistota 61 %; m/z pro $C_{73}H_{100}N_{14}O_{18}$ vypočteno 730,37 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 730,64.

7.11 Příprava sloučenin dle Schématu 14

V této kapitole jsou uvedeny postupy přípravy pro jednotlivé reakční kroky uvedené ve Schématu 14 a Tabulce 10.

Odstranění chránící Mtt skupiny (reakční podmínky i)

Zde bylo potřeba pryskyřici převést z plastové injekční stříkačky s filtrem do kulaté baňky. Reakční roztok byl připraven smícháním 0,4 ml triethylsilanu, 0,2 ml hexafluoro-2-propanolu, 0,1 ml 2,2,2-trifluoroethanolu a 1,3 ml 1,2-dichloroethanu. Reakce se prováděla 3,5 hodiny pod refluxem při 60 °C na magnetické míchačce (max 130 otáček). Po deprotekční reakci se pryskyřice opatrně přesunula zpět do nové stříkačky s filtrem a promyla se 5×DCM.

Navázání kyseliny sorbové (krok ii)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok kyseliny sorbové (22 mg), HOBt (30 mg) a DIC (0,031 ml) v 1 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 3 hodiny, následně promyta 5×DMF, 5×DCM.

Charakterizace látek ve Schématu 14

Intermediát 41C: LC/MS: metoda 1; $R_t = 2,40$ min; čistota 33 %; pro $C_{79}H_{106}N_{14}O_{19}$ vypočteno 777,39 $[M + 2H]^{2+}$, nalezeno 777,59.

7.12 Příprava sloučenin dle Schématu 16

V této kapitole jsou uvedeny postupy pro jednotlivé reakční kroky uvedené ve Schématu 16 a Tabulce 11.

Odstranění chránicí Dde skupiny (reakční podmínky i)

120 μ l 64% $N_2H_4 \cdot H_2O$ bylo smícháno se 6 ml DMF. Pryskyřice se s takto připraveným roztokem třepala 3 \times 3 minuty a poté se promyla 3 \times DMF, 3 \times DCM.

Navázání Fmoc-Lys(Mtt)-OH (krok ii)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok Fmoc-Lys(Mtt)-OH (0,375 g), HOBt (0,090 g) a DIC (0,094 ml) ve 3 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 2 hodiny, následně promyta 3 \times DMF, 3 \times DCM.

Odstranění chránicí Mtt skupiny (krok iii)

Zde bylo potřeba pryskyřici převést z plastové injekční stříkačky s filtrem do kulaté baňky. Reakční roztok byl připraven smícháním 0,4 ml triethylsilanu, 0,2 ml hexafluoro-2-propanolu, 0,1 ml 2,2,2-trifluoroethanolu a 1,3 ml 1,2-dichloroethanu. Reakce se prováděla 5 hodin pod refluxem při 60 °C na magnetické míchačce (max 130 otáček). Bylo zjištěno, že 3,5 ani 5 hodin nejsou dostatečný čas na úplné odchránění, a proto se reakční čas zvýšil až na 7 hodin. Po deprotektční reakci se pryskyřice opatrně přesunula zpět do nové stříkačky s filtrem a promyla se 5 \times DCM.

Navázání barviva fluorescein (krok iv)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok fluoresceinu (0,200 g), HOBt (0,090 g), DMAP (0,6 ekv., 0,044 g) a DIC (0,095 ml) ve 3 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 18 hodin, následně promyta 10 \times DMF, 10 \times DCM.

Odstranění chránicí Fmoc skupiny (krok v)

Chránicí Fmoc skupina se deprotekovala 50% roztokem piperidinu v DMF 15 minut. Poté se roztok promyl 3×DMF, 3×DCM.

Navázání 4-fluoro-3-nitrobenzoové kyseliny (krok vi)

Do stříkačky s pryskyřicí se přidal 0,2M roztok 4-fluoro-3-nitrobenzoové kyseliny (0,111 g), HOBt (0,090 g) a DIC (0,095 ml) ve 3 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Směs byla třepána za laboratorní teploty 7 hodin, následně promyta 5×DMF, 5×DCM.

Substituční reakce fluoru za hydroxylamin (krok vii)

Pryskyřice se promyla 5×pyridinem a poté se nechala reagovat s 1M roztokem NH₂OH.HCl (0,278 g) ve 4 ml pyridinu přes noc při pokojové teplotě. Pryskyřice byla promyta sekvencí 10×pyridin, 10×1% AcOH/DMF, 10×20% H₂O/DMF, 10×DMF, 10×DCM, 3×MeOH, poté zcela vysušena proudem dusíku a nakonec byla pryskyřice dána na lyofilizátor přes noc.

Charakterizace látek ve Schématu 16

Intermediát 45C: LC/MS: metoda 1; R_t = 3,57 min; čistota 70 %; m/z pro C₈₅H₁₀₅N₁₃O₁₉ vypočteno 805,89 [M + 2H]²⁺, nalezeno 806,07.

Intermediát 46C: LC/MS: metoda 1; R_t = 2,84 min; čistota 30 %; m/z pro C₇₇H₉₉N₁₅O₂₁ vypočteno 784,86 [M + 2H]²⁺, nalezeno 785,03.

7.13 Odštěpení sloučenin z pryskyřice

Příprava sloučenin 5A–5D

Připravené intermediáty **4A–D** byly odštěpeny z Rinkovy pryskyřice pomocí štěpícího koktejlu 50% TFA/DCM 3×15 min. Všechny tři frakce odštěpeného intermediátu **5A** se sesbíraly do vhodné nádoby a rozpouštědlo se nechalo odpařit pod proudem dusíku. Nádoba se sloučeninou **5A** se vložila na lyofilizátor a nechala se vysušit přes noc. Tento postup se opakoval identicky pro intermediáty **4B**, **4C** a **4D**.

Příprava stavebního bloku 16

Hotový stavební blok **15** byl odštěpen z Wangovy pryskyřice pomocí štěpícího koktejlu TFA v DCM (1:1, V/V) 3×15 min. Všechny tři frakce se sesbíraly do vhodné nádoby a

rozpouštědlo se nechalo odpařit pod proudem dusíku. Poté se přidal diethylether a vytvořila se mazlavá látka. Nádobka s látkou se nechala na chvíli zamrazit při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté byla vložena do ultrazvuku. Tento proces se opakoval, dokud se nevytvořil nemazlavý prášek. Nerozpustný prášek v diethyletheru se přesunul do plastové injekční stříkačky s filtrem, suspenze se přefiltrovala a zbytkové rozpouštědlo se nechalo odpařit pomocí dusíku. Stříkačka se sloučeninou **16** se poté vložila na lyofilizátor a nechala se vysušit přes noc.

Příprava stavebního bloku 36

Pryskyřice **35** byla podrobena štěpení z Wangovy pryskyřice pomocí štěpícího koktejlu TFA v DCM (1:1, V/V) 3×15 min. Všechny tři frakce se sesbíraly do vhodné nádoby a rozpouštědlo se nechalo odpařit pod proudem dusíku. Nádoba s látkou **36** se nakonec vložila na lyofilizátor přes noc.

Příprava finální části sondy E

Pryskyřice **46C** byla podrobena štěpení z Rinkovy pryskyřice pomocí štěpícího koktejlu TFA v DCM (1:1, V/V) 3×15 min. Všechny tři frakce odštěpené molekuly **E** se sesbíraly do vhodné nádoby a rozpouštědlo se nechalo odpařit pod proudem dusíku. Nádoba s látkou **E** se nakonec vložila na lyofilizátor přes noc.

8. Zkušební štěpení prekurzorů 5A-D proteázami

Všechny intermediáty **5A-D** se připravily v koncentraci $101,01\text{ }\mu\text{M}$, aby po přidání $10\text{ }\mu\text{l}$ enzymu k $990\text{ }\mu\text{l}$ roztoku intermediátu byla konečná koncentrace roztoku $100\text{ }\mu\text{M}$.

Vysušený produkt **5A** se rozpustil v $1,5\text{ ml}$ TRIS pufru a 2 ml DMSO. Z tohoto roztoku se odebralo $9,666\text{ }\mu\text{l}$ a zředilo TRIS na 1 ml . Intermediát **4B** nebyl rozpuštěn v 3 ml TRIS pufru a v $2,5\text{ ml}$ DMSO, proto se roztok přefiltroval a krystaly se vysušily na lyofilizátoru. Následně byly krystaly rozpuštěny v $0,1\text{ ml}$ DMSO a zředěny $4,85\text{ ml}$ TRIS pufru. Molekuly **5C** a **5D** byly rozpuštěny v $50\text{ }\mu\text{l}$ DMSO a zředěny na 5 ml TRIS pufrům. Z takto připravených roztoků intermediátů se odebralo $990\text{ }\mu\text{l}$ a měřilo se enzymatické štípání s přidavkem $10\text{ }\mu\text{l}$ enzymu.

9. Zkušební hetero Diels-Alderova reakce na modelovém systému

Bylo připraveno pět roztoků sloučeniny **RhB1** (3,71 μmol) a **36** (3,71 μmol) v 1 ml EtOH, do kterých se přidalo dané množství katalyzátoru Ph_2Se_2 – 0 mg, 0,058 mg (0,05 ekv.), 115 mg (0,1 ekv.), 0,221 mg (0,2 ekv.) a 0,427 mg (0,4 ekv.). Do každého reakčního roztoku se nakonec přidalo 17 μl 33% H_2O_2 (0,1855 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 50 ekv.) a reakční směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Při zkoumání detekčního limitu H_2O_2 bez katalyzátoru se pracovalo následovně: sloučenina **RhB1** (3,71 μmol) a **36** (3,71 μmol) se rozpustily v EtOH a 33% H_2O_2 se přidal v různých koncentracích – 0 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 0,0037 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (1 ekv.), 0,0191 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (5 ekv.) a 0,0371 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (10 ekv.). Reakce probíhala opět 1 hodinu za laboratorní teploty.

10. Fluorescenční měření

10.1 Základní fluorescenční charakteristika sloučenin E a RhB1

Základní fluorescenční charakteristika sloučeniny E (Graf 1 a 2)

Látka **E** se rozpustila v čistém DMSO na koncentraci 100 μM . 100 μl tohoto roztoku se zředilo TRIS pufrům vytemperovaným na 37 °C na 1 ml a konečnou koncentraci 10 μM . Následně se roztok přefiltroval do kyvety a nechal se 5 minut temperovat na 37 °C. Poté byla změřena fluorescenční spektra.

Excitační spektrum DEAC (Graf 1) se měřilo pro emisi v maximu 480 nm, emisní spektrum pak při excitaci v maximu 425 nm. Excitační spektrum fluoresceinu (Graf 2) se měřilo pro emisi v maximu 515 nm, emisní spektrum pak při excitaci v maximu 490 nm. Pro všechna měření se využil slit 5.

Základní fluorescenční charakteristika sloučeniny RhB1 (Graf 3 a 4)

Látka **RhB1** se rozpustila v čistém DMSO na koncentraci 100 μM . 100 μl tohoto roztoku se zředilo TRIS pufrům vytemperovaným na 37 °C na 1 ml a konečnou koncentraci

10 μM . Následně se roztok přefiltroval do kyvety a nechal se 5 minut temperovat na 37 °C. Poté byla změřena fluorescenční spektra.

Excitační spektrum bylo změřeno pro emisi v maximu 590 nm, emisní spektrum pak při excitaci v maximu 570 nm (Graf 3). Emisní spektrum (Graf 4) bylo změřeno při excitaci vlnovou délkou 425 nm. Pro všechna měření se využil slit 5.

10.2 Fotostabilita sloučenin E a RhB1

Fotostabilita látky E (Graf 5A-D, 6 a 7)

Měření látky E bylo prováděno v čistém TRIS pufru, v 5% a 20% roztoku DMSO/TRIS (viz. Graf 5A, B, D) a to při pokojové teplotě a roztok se nefiltroval. Roztok látky E v čistém TRIS pufru bylo potřeba 5-10 minut podrobit působení ultrazvuku, aby došlo k většinovému rozpuštění látky E. Roztoky s podílem DMSO byly připraveny jednoduchým rozpuštěním látky v DMSO o určité koncentraci a poté vhodně naředěny TRIS puftrem. Konečná koncentrace všech roztoků byla 10 μM .

Při měření v 10% DMSO/TRIS (viz. Graf 5C) se látka E rozpustila v DMSO a následně naředila TRIS puftrem předem vytemperovaným na 37 °C na konečnou koncentraci 10 μM . Před samotným měřením byl roztok zfiltrován a nechán temperovat dalších 5 minut na 37 °C.

Fotostabilita látky RhB1 (Graf 8A-B)

Při měření sloučeniny RhB1 v samotném TRIS se látka rozpustila ve vytemperovaném pufru na 37 °C na koncentraci 10 μM , přefiltrovala do kyvety a před samotným měřením se nechala 5 minut temperovat na 37 °C.

U roztoku RhB1 v 10% DMSO/TRIS se látka rozpustila v DMSO, vhodně naředila předem vytemperovaným TRIS puftrem na 37 °C na koncentraci 10 μM a před samotným měřením byla látka zfiltrována a dalších 5 minut temperována na 37 °C.

10.3 Měření teplotní závislosti sloučeniny E

Látka E se rozpustila v DMSO na roztok o koncentraci 100 μM a vhodně naředila vytemperovaným TRIS puftrem na laboratorní teplotu za vzniku 10% DMSO/TRIS roztoku o koncentraci 10 μM . Tento roztok se přefiltroval do kyvety a při laboratorní teplotě se změřilo emisní spektrum při excitaci 425 nm. Roztok se nechal 10 minut

temperovat na teplotu 35 °C a opět se změřilo spektrum. Takto se pokračovalo s teplotami 37, 39, 41 a 43 °C, čímž se uzavřel první cyklus měření.

V druhém cyklu měření se vzorek nechal opět 10 minut vychládnout na laboratorní teplotu a změřilo se spektrum. Postupovalo se identicky jako v prvním cyklu.

10.4 Odezva sondy E na přítomnost trypsinu

Všechna měření se prováděla v 10% roztoku DMSO/TRIS pufru o koncentraci sondy **E** 10 µM, před přípravou tohoto roztoku byl TRIS pufr vytemperován na 37 °C. Připravený roztok se přefiltroval do kyvety a 5 minut se temperoval na 37 °C před fluorescenčním měřením.

Při měření s enzymem se po vytemperování vzorku změřil blank, a poté se vždy přidalo 10 µl trypsinu o koncentraci 10, 100 nebo 1000 ng celkově v objemu 1 ml.

10.5 Odezva sloučenin E a RhB1 na přítomnost peroxidu vodíku

Všechna měření se prováděla s koncentrací látek 10 µM. TRIS pufr, resp. EtOH byl vytemperován na 37 °C, připravený roztok byl přefiltrován do kyvety a 5 minut se temperoval na 37 °C před fluorescenčním měřením.

Pokud se měřilo s H₂O₂, pak se vždy přidalo 50 µl 33% H₂O₂ a celková koncentrace roztoku **E**, resp. **RhB1** byla vždy 10 µM v celkovém objemu 1 ml.

Při zkušebním měření s H₂O se přidalo 50 µl H₂O a celková koncentrace roztoku **RhB1** byla opět 10 µM v celkovém objemu 1 ml.

Měření s molekulou rhodaminu B se provedlo s koncentrací rhodaminu B 10 µM v 10% DMSO/TRIS pufru, kdy TRIS byl předem vytemperován na 37 °C, připravený roztok byl přefiltrován do kyvety a 5 minut se temperoval na 37 °C. Poté se přidalo 50 µl 33% H₂O₂ a provedlo se fluorescenční měření.

Závěr

Předložená bakalářská práce je zaměřena na syntézu multifunkčních fluorescenčních sond pro simultánní detekci proteázy a peroxidu vodíku a ověření jejich předpokládaných fluorescenčních vlastností.

Teoretická část se zabývá problematikou metabolismu peroxidu vodíku, který patří do skupiny reaktivních forem kyslíku. Zároveň je v této části zahrnutý i základní přehled vyvinutých fluorescenčních sond pro detekci peroxidu vodíku a sond pro detekci trypsinu či chymotrypsinu za posledních 15 let.

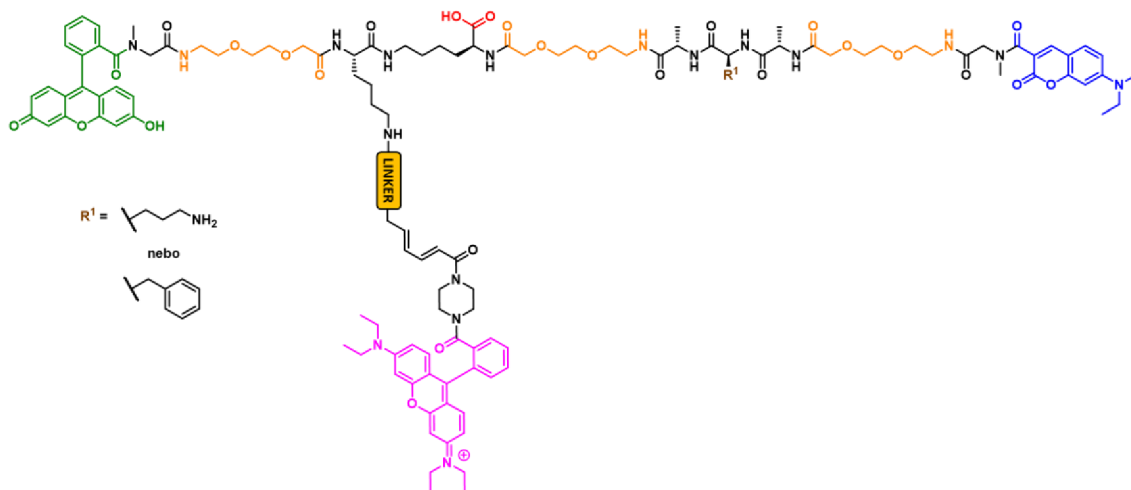
Hlavní obsah bakalářské práce spočíval ve vyvinutí jednoduché a reprodukovatelné přípravy navržených struktur **A-D** první části fluorescenčních sond. Během syntézy vyvstávaly nejrůznější problémy, které jsme co nejefektivněji a nejrychleji řešili. Nakonec se podařilo najít jednoduchý způsob přípravy první části sondy akorát s lehce odlišným skeletem od původního návrhu. Bohužel z časových důvodů byla připravena pouze jedna modifikace první části sondy molekula **E** namísto čtyř navržených, a tak se nepodařilo dosáhnout všech vytyčených cílů bakalářské práce.

Jediná připravená a přečištěná modifikace **E** byla podrobena fluorescenčnímu měření i s druhou částí sondy molekulou **RhB1**. Zjišťovala se fotostabilita, teplotní závislosti, a nakonec odezva na přítomnost peroxidu vodíku a trypsinu.

Druhá část sondy molekula **RhB1** byla zcela stabilní v roztoku. První část sondy **E** vykazovala nestabilitu v čase, pravděpodobně z důvodu špatné rozpustnosti v TRIS pufru, a závislost na teplotě se neprokázala. Samotná část sondy **E** byla podrobena enzymatické reakci s různými koncentracemi trypsinu. Experiment potvrdil, že molekula **E** může být využita pro detekci trypsinu, kdy jsou patrné výrazné změny ve fluorescenčním profilu už při koncentraci trypsinu 10 ng/1 ml v časovém rozsahu měření 50 minut. Dohromady se obě části sondy **E/RhB1** měřily při detekci peroxidu vodíku. Fluorescenční profil vykazoval změnu jako odezvu na přítomnost peroxidu vodíku, nicméně došlo ke změně zcela opačné, než jsme předpokládali. Po řadě experimentů jsme zjistili, že za odezvu je zodpovědná pouze druhá část sondy molekula **RhB1**, a jen za specifických podmínek, kdy v roztoku musí být přítomen TRIS pufr a peroxid vodíku. Jedině pak dochází k rozkladu molekuly **RhB1**, a tedy ztrátě fluorescenčního signálu.

Závěrem tedy můžeme říct, že jsme úspěšně ověřili princip fluorescenční detekce trypsinu i peroxidu vodíku naší sondou, i když princip detekce peroxidu se ukázal být jiný než původně navržený. Nevýhodou naší sondy je nízká rozpustnost, která nedovoluje snížit limit detekce.

Na základě těchto zjištění můžeme předběžně navrhnout změny v další generaci našich sond pro simultánní detekci peroxidu vodíku a proteázy (Obr. 55). Z důvodu špatné rozpustnosti molekuly **E** v TRIS pufru lze do skeletu zařadit více molekul PEG (oranžově zvýrazněné), které by měly rozpustnost zvýšit, a dále můžeme vynechat aminokyselinu β -alanin a pro syntézu využít Wangovu pryskyřici místo Rinkovy, abychom získali polárnější karboxylovou skupinu oproti aminoskupině (zvýrazněno červeně). Jelikož detekce peroxidu vodíku je založena na jiném principu, než je hetero Diels-Alderova reakce mezi částmi sondy **E** a **RhB1**, hydroxylaminová skupina na první části sondy nemusí být tudíž přítomna. Díky tomu budeme schopni navázat barvivo fluorescein na sekundární aminovou skupinu sarkosinu, a tím zvýšit stabilitu fluorescenčního signálu. Dále by se sonda nemusela skládat ze dvou částí, pokud by se nám podařilo navázat molekulu **RhB1**, která odráží přítomnost peroxidu vodíku v roztoku, na skelet první část sondy.



Obr. 55: Nový návrh modifikované fluorescenční sondy pro simultánní detekci peroxidu vodíku a proteázy.

Použitá literatura

- (1) Terai, T.; Nagano, T. Fluorescent Probes for Bioimaging Applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (5), 515–521.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.08.007>.
- (2) NAGANO, T. Development of Fluorescent Probes for Bioimaging Applications. *Proc. Japan Acad. Ser. B* **2010**, *86* (8), 837–847.
<https://doi.org/10.2183/pjab.86.837>.
- (3) Kim, H. M.; Jung, C.; Kim, B. R.; Jung, S.-Y.; Hong, J. H.; Ko, Y.-G.; Lee, K. J.; Cho, B. R. Environment-Sensitive Two-Photon Probe for Intracellular Free Magnesium Ions in Live Tissue. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46* (19), 3460–3463. <https://doi.org/10.1002/anie.200700169>.
- (4) Kim, H. M.; Kim, B. R.; Hong, J. H.; Park, J.-S.; Lee, K. J.; Cho, B. R. A Two-Photon Fluorescent Probe for Calcium Waves in Living Tissue. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46* (39), 7445–7448. <https://doi.org/10.1002/anie.200701720>.
- (5) Kikuchi, K.; Komatsu, K.; Nagano, T. Zinc Sensing for Cellular Application. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8* (2), 182–191.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.02.007>.
- (6) Cao, H.; Heagy, M. D. Fluorescent Chemosensors for Carbohydrates: A Decade's Worth of Bright Spies for Saccharides in Review. *J. Fluoresc.* **2004**, *14* (5), 569–584. <https://doi.org/10.1023/B:JOFL.0000039344.34642.4c>.
- (7) Sato, D.; Kato, T. Novel Fluorescent Substrates for Detection of Trypsin Activity and Inhibitor Screening by Self-Quenching. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26* (23), 5736–5740. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.10.053>.
- (8) Soh, N. Recent Advances in Fluorescent Probes for the Detection of Reactive Oxygen Species. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (3), 532–543.
<https://doi.org/10.1007/s00216-006-0366-9>.
- (9) Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. L. F. C. Use of Fluorescence Probes for Detection of Reactive Nitrogen Species: A Review. *J. Fluoresc.* **2006**, *16* (1), 119–139. <https://doi.org/10.1007/s10895-005-0030-3>.
- (10) O'Neil, E. J.; Smith, B. D. Anion Recognition Using Dimetallic Coordination

- Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250* (23), 3068–3080.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.006>.
- (11) Urano, Y.; Asanuma, D.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Barrett, T.; Kamiya, M.; Nagano, T.; Watanabe, T.; Hasegawa, A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Selective Molecular Imaging of Viable Cancer Cells with PH-Activatable Fluorescence Probes. *Nat. Med.* **2009**, *15* (1), 104–109. <https://doi.org/10.1038/nm.1854>.
- (12) Duan, N.; Yang, S. Research Progress on Multifunctional Fluorescent Probes for Biological Imaging, Food and Environmental Detection. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2022**, 1–43. <https://doi.org/10.1080/10408347.2022.2098670>.
- (13) Zhang, W.; Huo, F.; Cheng, F.; Yin, C. Employing an ICT-FRET Integration Platform for the Real-Time Tracking of SO₂ Metabolism in Cancer Cells and Tumor Models. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (13), 6324–6331.
<https://doi.org/10.1021/jacs.0c00992>.
- (14) Lismont, C.; Revenco, I.; Fransen, M. Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20153673>.
- (15) Aoshiba, K.; Yasuda, K.; Yasui, S.; Tamaoki, J.; Nagai, A. Serine Proteases Increase Oxidative Stress in Lung Cells. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2001**, *281* (3), L556–L564. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.3.L556>.
- (16) Yuan, L.; Lin, W.; Zhu, S.; Zheng, K.; He, L. Single Fluorescent Probe Distinguishes Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in Cell Imaging. In *Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, Part A*; Cadenas, E., Packer, L. B. T.-M. in E., Eds.; Academic Press, 2013; Vol. 526, pp 83–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405883-5.00005-3>.
- (17) Boudková, P. Hodnocení Testů Buněčné Viability in Vitro. Diplomová práce, Univerzita Pardubice, 2019.
- (18) Zelko, I. N.; Mariani, T. J.; Folz, R. J. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33* (3), 337–349. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00905-X).
- (19) Lippert, A. R.; Van de Bittner, G. C.; Chang, C. J. Boronate Oxidation as a Bioorthogonal Reaction Approach for Studying the Chemistry of Hydrogen Peroxide in Living Systems. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 793–804.
<https://doi.org/10.1021/ar200126t>.

- (20) Wen, Y.; Liu, K.; Yang, H.; Li, Y.; Lan, H.; Liu, Y.; Zhang, X.; Yi, T. A Highly Sensitive Ratiometric Fluorescent Probe for the Detection of Cytoplasmic and Nuclear Hydrogen Peroxide. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (19), 9970–9976. <https://doi.org/10.1021/ac502909c>.
- (21) Andrés, C. M. C.; Pérez de la Lastra, J. M.; Juan, C. A.; Plou, F. J.; Pérez-Lebeña, E. Chemistry of Hydrogen Peroxide Formation and Elimination in Mammalian Cells, and Its Role in Various Pathologies. *Stresses* **2022**, *2* (3), 256–274. <https://doi.org/10.3390/stresses2030019>.
- (22) Snezhkina, A. V.; Kudryavtseva, A. V.; Kardymon, O. L.; Savvateeva, M. V.; Melnikova, N. V.; Krasnov, G. S.; Dmitriev, A. A. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 6175804. <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>.
- (23) Walker, C. L.; Pomatto, L. C. D.; Tripathi, D. N.; Davies, K. J. A. Redox Regulation of Homeostasis and Proteostasis in Peroxisomes. *Physiol. Rev.* **2018**, *98* (1), 89–115. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2016>.
- (24) Battelli, M. G.; Polito, L.; Bortolotti, M.; Bolognesi, A. Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/3527579>.
- (25) Panday, A.; Sahoo, M. K.; Osorio, D.; Batra, S. NADPH Oxidases: An Overview from Structure to Innate Immunity-Associated Pathologies. *Cell. Mol. Immunol.* **2015**, *12* (1), 5–23. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.89>.
- (26) Zanger, U. M.; Schwab, M. Cytochrome P450 Enzymes in Drug Metabolism: Regulation of Gene Expression, Enzyme Activities, and Impact of Genetic Variation. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138* (1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.
- (27) Porubsky, P. R.; Meneely, K. M.; Scott, E. E. Structures of Human Cytochrome P-450 2E1: INSIGHTS INTO THE BINDING OF INHIBITORS AND BOTH SMALL MOLECULAR WEIGHT AND FATTY ACID SUBSTRATES*. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (48), 33698–33707. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805999200>.
- (28) Vishvakarma, R.; Mishra, A. Protective Effect of a Protease Inhibitor from *Agaricus Bisporus* on *Saccharomyces Cerevisiae* Cells against Oxidative Stress. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2019**, *49* (3), 244–254.

- <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1536992>.
- (29) Vogt, P. F.; Miller, M. J. Development and Applications of Amino Acid-Derived Chiral Acylnitroso Hetero Diels-Alder Reactions. *Tetrahedron* **1998**, *54* (8), 1317–1348. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)10072-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)10072-2).
- (30) Kopp Ioannis; Knochel, Paul, F. S. Preparation of Polyfunctional Amines by the Addition of Functionalized Organomagnesium Reagents to Nitrosoarenes. *Synlett* **2003**, *2003* (06), 885–887. <https://doi.org/10.1055/s-2003-38738>.
- (31) Penoni, A.; Volkmann, J.; Nicholas, K. M. Regioselective Synthesis of Indoles via Reductive Annulation of Nitrosoaromatics with Alkynes. *Org. Lett.* **2002**, *4* (5), 699–701. <https://doi.org/10.1021/ol017139e>.
- (32) Priewisch, B.; Rück-Braun, K. Efficient Preparation of Nitrosoarenes for the Synthesis of Azobenzenes. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (6), 2350–2352. <https://doi.org/10.1021/jo048544x>.
- (33) Molander, G. A.; Cavalcanti, L. N. Nitrosation of Aryl and Heteroaryltrifluoroborates with Nitrosonium Tetrafluoroborate. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (9), 4402–4413. <https://doi.org/10.1021/jo300551m>.
- (34) Bordoloi, A.; Halligudi, S. B. Tungsten- and Molybdenum-Based Coordination Polymer-Catalyzed N-Oxidation of Primary Aromatic Amines with Aqueous Hydrogen Peroxide. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (13), 2085–2088. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700224>.
- (35) Gowenlock, B. G.; Richter-Addo, G. B. Preparations of C-Nitroso Compounds. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (7), 3315–3340. <https://doi.org/10.1021/cr030450k>.
- (36) Fountoulaki, S.; Gkizis, P. L.; Symeonidis, T. S.; Kaminioti, E.; Karina, A.; Tamiolakis, I.; Armatas, G. S.; Lykakis, I. N. Titania-Supported Gold Nanoparticles Catalyze the Selective Oxidation of Amines into Nitroso Compounds in the Presence of Hydrogen Peroxide. *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358* (9), 1500–1508. <https://doi.org/10.1002/adsc.201500957>.
- (37) Zhao, D.; Johansson, M.; Bäckvall, J.-E. In Situ Generation of Nitroso Compounds from Catalytic Hydrogen Peroxide Oxidation of Primary Aromatic Amines and Their One-Pot Use in Hetero-Diels–Alder Reactions. *European J. Org. Chem.* **2007**, *2007* (26), 4431–4436. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200700368>.
- (38) Sakaue, S.; Sakata, Y.; Nishiyama, Y.; Ishii, Y. Oxidation of Aliphatic and Aromatic Amines with Hydrogen Peroxide Catalyzed by Peroxoheteropoly

- Oxometalates. *Chem. Lett.* **1992**, 21 (2), 289–292.
<https://doi.org/10.1246/cl.1992.289>.
- (39) Shao, L.; Li, Y.; Lu, J.; Jiang, X. Recent Progress in Selenium-Catalyzed Organic Reactions. *Org. Chem. Front.* **2019**, 6 (16), 2999–3041.
<https://doi.org/10.1039/C9QO00620F>.
- (40) Terai, T.; Nagano, T. Small-Molecule Fluorophores and Fluorescent Probes for Bioimaging. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **2013**, 465 (3), 347–359.
<https://doi.org/10.1007/s00424-013-1234-z>.
- (41) Chen, W.; Xian, M. Washington Red (WR) Dyes and Their Imaging Applications. In *Chemical Tools for Imaging, Manipulating, and Tracking Biological Systems: Diverse Methods Based on Optical Imaging and Fluorescence*; Chenoweth, D. M. B. T.-M. in E., Ed.; Academic Press, 2020; Vol. 640, pp 149–163. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.04.027>.
- (42) Fu, Y.; Finney, N. S. Small-Molecule Fluorescent Probes and Their Design. *RSC Adv.* **2018**, 8 (51), 29051–29061. <https://doi.org/10.1039/C8RA02297F>.
- (43) Abo, M.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Komatsu, T.; Nagano, T. Development of a Highly Sensitive Fluorescence Probe for Hydrogen Peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (27), 10629–10637.
<https://doi.org/10.1021/ja203521e>.
- (44) Karton-Lifshin, N.; Segal, E.; Omer, L.; Portnoy, M.; Satchi-Fainaro, R.; Shabat, D. A Unique Paradigm for a Turn-ON Near-Infrared Cyanine-Based Probe: Noninvasive Intravital Optical Imaging of Hydrogen Peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (28), 10960–10965. <https://doi.org/10.1021/ja203145v>.
- (45) Wen, Y.; Xue, F.; Lan, H.; Li, Z.; Xiao, S.; Yi, T. Multicolor Imaging of Hydrogen Peroxide Level in Living and Apoptotic Cells by a Single Fluorescent Probe. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 91, 115–121.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.027>.
- (46) Liu, K.; Shang, H.; Kong, X.; Ren, M.; Wang, J.-Y.; Liu, Y.; Lin, W. A Novel Near-Infrared Fluorescent Probe for H₂O₂ in Alkaline Environment and the Application for H₂O₂ Imaging in Vitro and in Vivo. *Biomaterials* **2016**, 100, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.029>.
- (47) Zuo, Y.; Jiao, Y.; Ma, C.; Duan, C. A Novel Fluorescent Probe for Hydrogen Peroxide and Its Application in Bio-Imaging. *Molecules*. 2021.
<https://doi.org/10.3390/molecules26113352>.

- (48) Kaur, J.; Malegaonkar, J. N.; Bhosale, S. V.; Singh, P. K. An Anionic Tetraphenyl Ethylene Based Simple and Rapid Fluorescent Probe for Detection of Trypsin and Paraoxon Methyl. *J. Mol. Liq.* **2021**, *333*, 115980. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115980>.
- (49) Lan, T.; Tian, Q.; Li, M.; He, W. Activatable Endoplasmic Reticulum-Targeted NIR Fluorescent Probe with a Large Stokes Shift for Detecting and Imaging Chymotrypsin. *Analyst* **2022**, *147* (18), 4098–4104. <https://doi.org/10.1039/D2AN01013E>.
- (50) Qu, Y.; Xu, Z.; Wang, J.; Liu, W.; Iqbal, A.; Iqbal, K.; Su, Y.; Cao, Y.; Yang, J.; Qin, W.; Liu, Y. Strong Red Fluorescent Probe for Detecting Chymotrypsin Activity in Vivo and in Vitro. *Sensors Actuators B Chem.* **2023**, *382*, 133552. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.133552>.
- (51) Braatz, J. A.; Elias, C.; Finny, J. G.; Tran, H.; McCaman, M. Quantitation of Residual Trypsin in Cell-Based Therapeutics Using Immobilized α -1-Antitrypsin or SBTI in an ELISA Format. *J. Immunol. Methods* **2015**, *417*, 131–133. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.009>.
- (52) Piovarci, I.; Hianik, T.; Ivanov, I. N. Detection of Chymotrypsin by Optical and Acoustic Methods. *Biosensors*. 2021. <https://doi.org/10.3390/bios11030063>.
- (53) Dong, M.; Qi, H.; Ding, S.; Li, M. Electrochemical Determination of Trypsin Using a Heptapeptide Substrate Self-Assembled on a Gold Electrode. *Microchim. Acta* **2015**, *182* (1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1295-5>.
- (54) Lefkowitz, R. B.; Marciniak, J. Y.; Hu, C.-M.; Schmid-Schönbein, G. W.; Heller, M. J. An Electrophoretic Method for the Detection of Chymotrypsin and Trypsin Activity Directly in Whole Blood. *Electrophoresis* **2010**, *31* (2), 403–410. <https://doi.org/10.1002/elps.200900424>.
- (55) Karaseva, N. A.; Pluhar, B.; Beliaeva, E. A.; Ermolaeva, T. N.; Mizaikoff, B. Synthesis and Application of Molecularly Imprinted Polymers for Trypsin Piezoelectric Sensors. *Sensors Actuators B Chem.* **2019**, *280*, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.022>.
- (56) Kaur, J.; Singh, P. K. Trypsin Detection Strategies: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2022**, *52* (5), 949–967. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1846490>.
- (57) Xu, K.; Liu, F.; Ma, J.; Tang, B. A New Specific Fullerene-Based Fluorescent Probe for Trypsin. *Analyst* **2011**, *136* (6), 1199–1203. <https://doi.org/10.1039/C0AN00576B>.

- (58) Wang, L.; Shi, F.; Li, Y.; Su, X. An Ultra-Sensitive and Label-Free Fluorescent Probe for Trypsin and Inhibitor Based on DNA Hosted Cu Nanoclusters. *Sensors Actuators B Chem.* **2016**, *222*, 945–951.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.09.024>.
- (59) Song, L.; Zhang, L.; Xu, K.; Huang, Y.; Gao, P.; Fang, H.; Zhang, J.; Nie, Z.; Chen, T. Fluorescent Microsphere Probe for Rapid Qualitative and Quantitative Detection of Trypsin Activity. *Nanoscale Adv.* **2019**, *1* (1), 162–167.
<https://doi.org/10.1039/C8NA00111A>.
- (60) Sakurai, M.; Kawakami, R.; Kihara, N. TBSOTf-Promoted Versatile N-Formylation Using DMF at Room Temperature. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60* (18), 1291–1294. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.04.010>.