UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie

Radka Urbanovská

Syntéza derivátů pyrimidinu jako nových fluorescenčních značek

Diplomová práce

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie B1407

Vedoucí práce: Mgr. Soňa Křupková, Ph.D.

Olomouc 2015

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Soni Křupkové, a že tato práce nebyla použita k získání jiného vysokoškolského titulu. Veškerá použitá literatura je uvedena na konci diplomové práce.

V Olomouci dne 18. 5. 2015 ……..

Radka Urbanovská

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych tímto upřímně poděkovat především Mgr. Soni Křupkové, Ph.D. za obětavou pomoc, trpělivost, neutuchající motivaci a důvěru, cenné připomínky a rady při řešení a zpracování dané problematiky. Ráda bych poděkovala všem pracovníkům Katedry organické chemie PřF UP za ochotu a pomoc a v neposlední řadě mé rodině a příteli za trpělivost a podporu.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Radka Urbanovská

Název práce: Syntéza derivátů pyrimidinu jako nových fluorescenčních značek.

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Ústav molekulární a translační medicíny, Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Soňa Křupková, Ph.D.

Rok obhajoby: 2015

Abstrakt:

Předložená diplomová práce je zaměřena na syntézu nových fluorescenčních značek obsahujících systém pyrimidin-rhodamin. Práce je členěna do dvou částí. První z nich, teoretická část, je věnována již známým fluorescenčním značkám, především pH indikátorům a multifunkčním sondám. Popsány jsou také mitochondrie jako potenciální cílové organely. V experimentální části jsou popsány vylepšené reakční podmínky vedoucí k výchozím derivátům pyrimidinu a také všechny modifikace vyzkoušené za účelem zlepšení vazby v buňce. Součástí práce je kapitola s fluorescenčními vlastnostmi všech cílových látek a také výsledky studie penetrace přes buněčnou membránu.

Klíčová slova: fluorescenční značky, pyrimidin, Rhodamin B, mitochondrie

Počet stran: 80

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Author´s first name and surname: Radka Urbanovská

Title:	Synthesis of pyrimidine derivatives as new fluorescent probes.
Type of thesis:	Diploma
Department:	Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc Institut of Molecular and Translational Medicine, Olomouc
Supervisor:	Mgr. Soňa Křupková, Ph.D.
The year of presentation:	2015

Abstract:

The submitted diploma thesis is focused on development of new fluorescent probes containing pyrimidine-rhodamine B system. The diploma thesis is divided into two parts. The first one, theoretical part, is aimed to overview known fluorescent probes, such as pH indicators and multifunctional probes. There is also description of mitochondria as potencial target organels. The experimental part describes improved reaction conditions leading to the starting pyrimidine derivatives and also all modifications tried to improve binding within a cell. The work includes a chapter with fluorescent properties of target molecules and also results of penetration through the cell membrane study.

Keywords:	fluorescent probes, pyrimidine, Rhodamine B, mitochondria
Number of pages:	80
Number of appendixes:	0
Language:	Czech

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK **7**

ÚVOD **9**

CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE **10**

TEORETICKÁ ČÁST **11**

I. FLUORESCENČNÍ ZNAČKY 11
i. pH indikátory *13*
ii. Multifunkční sondy *22*
II. ZNAČENÍ MITOCHONDRIÍ 27
i. Funkce mitochondrií v lidském těle *28*
ii. Vlastnosti sond specifických pro mitochondrie *33*

VÝSLEDKY A DISKUZE **37**

III. PŘÍPRAVA CÍLOVÝCH LÁTEK SYSTÉMU PYRIMIDIN-RHODAMIN 40
IV. REAKTIVITA CÍLOVÝCH LÁTEK 50
i. Reaktivita s thiolovými skupinami *50*
ii. Reaktivita s amino skupinami *52*
V. FLUORESCENČNÍ VLASTNOSTI LÁTEK 54
i. Základní fluorescenční vlastnosti *54*
ii. Závislost fluorescence na pH *55*
iii. Fotostabilita *55*
VI. STABILITA 58
VII. MĚŘENÍ PENETRACE CÍLOVÝCH LÁTEK DO BUNĚK 60

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **62**

i. Metody *62*
ii. Přípravy *62*

ZÁVĚR **75**

SEZNAM LITERATURY **77**

SEZNAM ZKRATEK

AcO	acetylová skupina
ADP	adenosindifosfát
AM	acetoxymethyl
ATP	adenosintrifosfát
BCECF	2',7'-bis-(2-karboxyethyl)-5/6-karboxyfluorescein
Boc	di-*tert*-butylkarbonát
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
BzO	benzoylová skupina
C.SNARF-1	karboxy-SNARF-1
CCD kamera	zařízení s vázanými náboji
CDCF	5/6-karboxydichlorofluorescein
Cys	cystein
DBU	1,8-diazabicykloundec-7-en
DCM	dichlormethan
DGT	dansylglycinyl-L-tryptofan
DIC	*N,N'*-Diisopropylkarbodiimid
DIEA	*N,N*-diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EtMeNBDP	*N*-ethylmethyl-BODIPY
FMN	flavinmononukleotid
Fmoc	9-fluorenylmethylkarbamát
GFP	zelený fluorescenční protein
Gly	glycin
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
Lys	lysin
M	$mol.dm^{-3}$

MDR	multidrug rezistance=léková rezistence
Me_3SiO	trimethylsilylová skupina
MeCN	acetonitril
MELAS	mitochondriální encefalopatie+laktátová acidóza+iktus
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NADH	redukovaný nikotinadenindinukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonance
NR2	dialkylamino skupina
PeT	fotoindukovaný přenos elektronů
Phe	fenylalanin
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT	laboratorní teplota
SNAFL	seminaftofluorescein
SNAFR	seminaftofluoron
SNARF	seminaftorhodafluor
TBAHS	tetrabutylamoniumhydrogensulfát
TFA	kyselina trifluoroctová
TIM komplex	translokáza vnitřní membrány
TIS	triisopropylsilan
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TOM komplex	translokáza vnější membrány
Tpy	4'-(aminomethylfenyl)-2,2':6',2''-terpyridin
Trt	trifenylmethylová skupina
UCP1	uncoupling protein 1=thermogenin

ÚVOD

Jedním z mnoha fenoménů přírody je bezpochyby fluorescence se svou schopností absorbovat a následně emitovat fotony s vyšší vlnovou délkou. Tento objev má velký vliv na biologický a medicinální výzkum. Vědci mohou nyní nejen vizualizovat normální fyziologické procesy s vysokým rozlišením, detekovat několik signálů současně, stopovat jednotlivé molekuly *in vivo*, ale také nahradit radioaktivní metody méně škodlivými či vnést jasno do mnoha patologických procesů.[1]

Na druhou stranu není vždy jednoduché najít vhodnou fluorescenční značku, která by splňovala všechny parametry (kvantový výtěžek, Stokesův posun, fotostabilita, reaktivita, permeabilita, atd.) potřebné pro dané účely. Přestože již bylo vyvinuto mnoho fluorescenčních značek různých vlastností, literatura uvádí jen málo příkladů multifunkčních fluorescenčních značek, tj. značek, které jsou schopny detekovat více než jeden parametr.

Jednou z nejstarších skupin fluorescenčních barviv jsou rhodaminy vyznačující se dobrými fotochemickými a fotofyzikálními vlastnostmi. Jelikož jednou z výhod těchto fluoroforů je schopnost penetrovat přes buněčnou membránu a akumulovat se v mitochondriích, našla tato barviva uplatnění mimo jiné i v oblasti biologických studií.

V nedávné době byla na naší katedře vyvinuta metoda na přípravu látek s potencionálním využitím jako multifunkční značky. Tyto sloučeniny obsahující pyrimidinový a rhodaminový skelet byly připraveny s využitím syntézy na pevné fázi a kombinatoriálního přístupu. Bylo zjištěno, že některé z těchto derivátů mohou být využity jako pH a teplotní indikátory a navíc jsou schopny projít přes buněčnou membránu.

Cílem této diplomové práce je modifikace těchto systémů, tak aby byly schopny tvořit kovalentní vazbu s proteiny v mitochondriální membráně a zachytit se tak uvnitř buňky pro další biologické studie.

CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce je příprava série látek se systémem rhodamin-pyrimidin **3** s využitím syntézy na pevné fázi *(Schéma I)*. Po změření základních fluorescenčních vlastností těchto sloučenin jsou u vybraných derivátů studovány závislosti fluorescence na pH a teplotě. Další studovanou vlastností je reaktivita těchto derivátů s thiolovou nebo amino skupinou v postranních řetězcích aminokyselin, respektive peptidů. Na závěr pak bude testována jejich schopnost penetrovat přes buněčnou membránu.

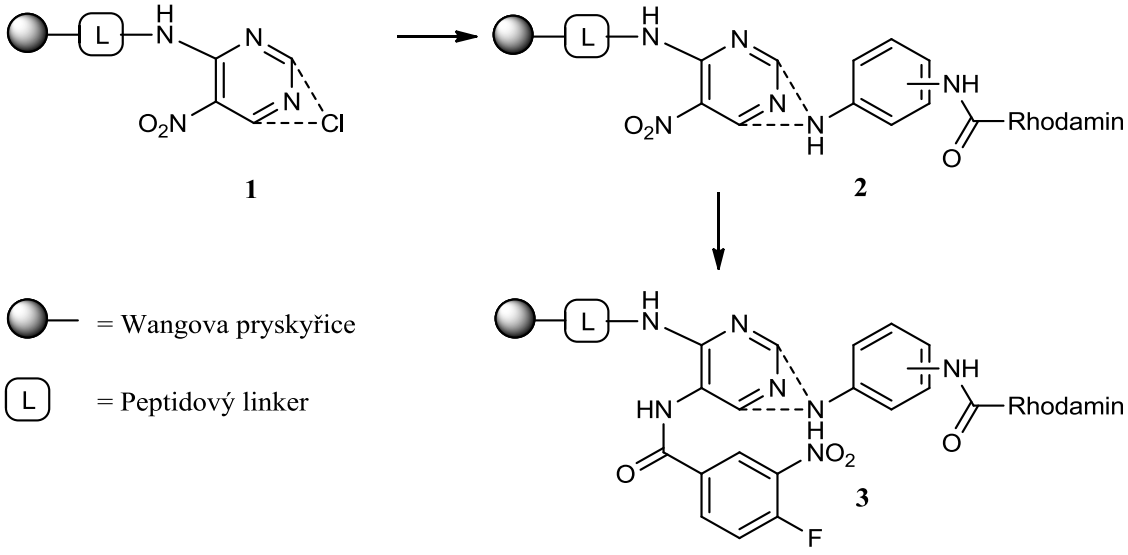


Schéma I: Přehled struktur cílových derivátů.

Dílčí cíle práce lze shrnout v následujících bodech:

- Příprava série látek se systémem rhodamin-pyrimidin.
- Měření fluorescenčních vlastností cílových látek.
- Testování připravených derivátů na penetraci do buněk.

TEORETICKÁ ČÁST

V roce 2008 získali vědci Osamu Šimomura, Martin Chalfie a Roger Y. Tsien Nobelovu cenu za chemii[2] za objev a výzkum Zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Tento protein byl izolován z medúzy a patří mezi nejznámější a nejpoužívanější fluorescenční značky. Podrobněji bude GFP rozebrán v kapitole Fluorescenční značky.

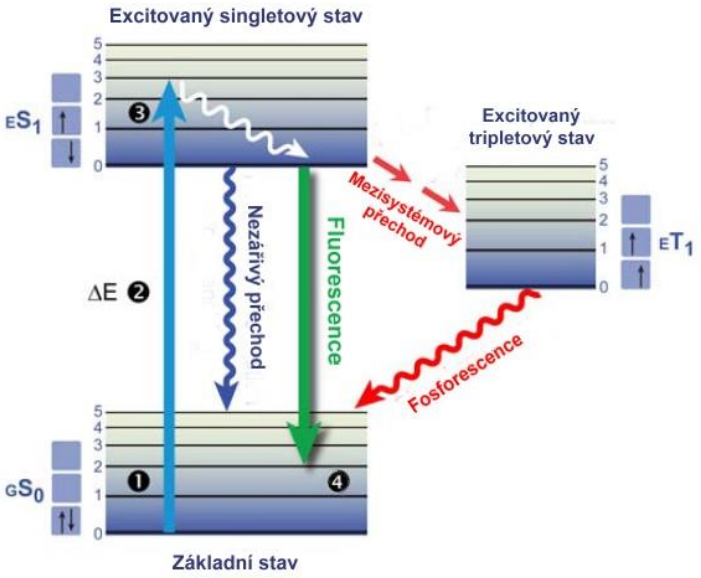
I. FLUORESCENČNÍ ZNAČKY

Jak již bylo řečeno v úvodu, objev fluorescence má velký biologický i biomedicínský význam.

Samotná luminiscence může být definována jako spontánní emise záření z elektronově nebo vibračně excitované látky, která není v rovnováze s prostředím.[3] Dělíme ji především na fluorescenci a fosforescenci. Mezi další typy luminiscence patří např. bioluminiscence produkovaná živými organismy, chemiluminiscence způsobená chemickou reakcí či mechanoluminiscence vytvářející záření po poškození krystalové struktury látky[1,4].

Fluorescence vzniká absorpcí fotonů a jejich energie za vzniku excitovaného stavu elektronů. Tento jev probíhá pouze u látek s vhodnými elektrony a jejich správnou distribucí v energetické hladině. Téměř ihned dochází k emisi záření o nižší energii, tzn. vyšší vlnové délce než záření absorbované. Tento jev poprvé popsal Sir George Stokes ve své publikaci z roku 1852[5] a od té doby je nazýván Stokesovým posunem.

U déle trvající fosforescence dochází navíc k přechodu ze singletového excitovaného stavu na tripletový a zároveň ke změně spinu. Navrácení elektronu do normálního stavu je zakázaným přechodem, proto vyzáření fotonů trvá déle. Oba typy fotoluminiscence lze znázornit tzv. Jablonského diagramem *(Obrázek I)*.



Obrázek I: Jablonského diagram.[1]

Ve fluorescenční spektroskopii může docházet k různým procesům, kterých je poté využíváno v diagnostických metodách. Prvním z nich je zhášení fluorescence, ke kterému dochází, pokud se k fluoroforu v excitovaném stavu přiblíží tzv. zhášedlo (quencher). Fluorofor se vrátí do základního stavu a k vyzáření fotonů poté dojde v omezené míře nebo vůbec. Přesný mechanismus vždy závisí na konkrétním páru molekul. Jako zhášedlo můžou vystupovat halogeny, případně těžké kovy.[6]

Dalším známějším procesem je například fluorescenční (Försterův) rezonanční přenos energie. K tomuto přenosu dochází, pokud se emisní spektrum jednoho fluoroforu (donor) překrývá s absorpčním spektrem druhého (akceptor). V případě dostatečné blízkosti obou molekul dojde prostřednictví dipól-dipólové interakce k předání energie mezi donorem a akceptorem.[6]

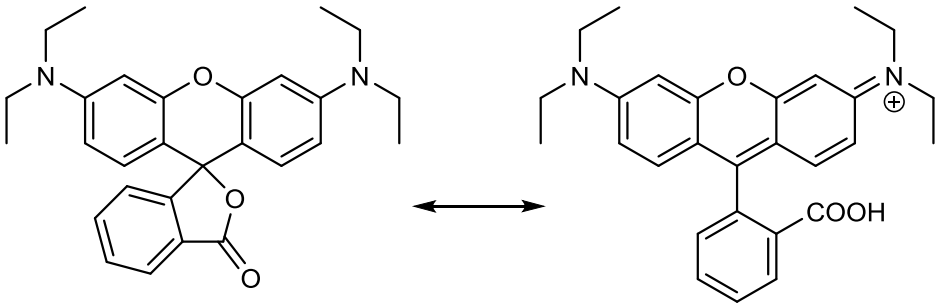
Jak již bylo v úvodu zmíněno, fluorescence je jev, který se využívá u nedestruktivních, vysoce citlivých analytických či bioanalytických metod jako fluorescenční spektrometrie, fluorescenční mikroskopie nebo průtoková cytometrie. Praktické využití fluorescence se zaměřením na měření intracelulárního pH včetně příkladů používaných barviv probereme v následujících kapitolách.

i. pH indikátory

Změna barvy lakmusu či fenolftaleinu v závislosti na pH prostředí je známá již dětem na základní škole. Pro měření intracelulárního pH je ale zapotřebí selektivnějších indikátorů, které jsou vhodné pro použití v buněčných systémech a pro následné vyhodnocení spektrálními metodami.

Intracelulární pH hraje důležitou roli v aktivitách buňky, jako je proliferace, apoptóza, léková rezistence (multidrug resistence, MDR), transport iontů, endocytóza či svalové kontrakce. Abnormální pH uvnitř buňky značí problémy v růstu, funkci a je spojené i s nemocemi typu rakovina či Alzheimerova choroba.[7,8] V cytosolu se hodnota pH pohybuje v rozmezí přibližně 6,8 – 7,4, v kyselých organelách dosahuje až hodnot 4,5 - 6.[9]

pH indikátory musí obsahovat skupinu přijímající H^+. U fluoresceinových a rhodaminových barviv dochází v bezbarvé formě k tvorbě laktonu **1a**, který se po přijetí protonu uvolní a začne fluoreskovat **1b** *(Obrázek II).*



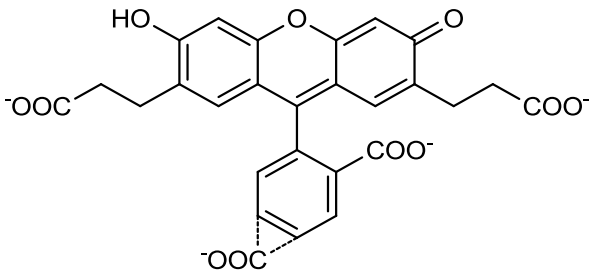
1a **1b**

Rhodamin B **Rhodamin B**

Obrázek II: Bezbarvá a fluoreskující forma rhodaminu B.

Na začátku bych chtěla uvést fluorescein a jeho derivát 2‘,7‘-bis-(2-karboxyethyl)-5/6-karboxyfluorescein (BCECF), který zavedl Roger Tsien už v roce 1982.[10] Fluorescein patří mezi základní indikátory, ale protože z buňky velmi rychle uniká, dává se přednost jiným. [11]

BCECF **2** *(Obrázek III)* se používá pro pH v rozmezí 6,5 – 7,5 a s excitačním poměrem 490/440 nm. Kvůli zvýšení propustnosti přes membránu se vyrábí v podobě acetoxymethyl esteru AM a využívá se k měření intracelulárního pH a viability buněk. V buňce zůstává déle než fluorescein z důvodu většího počtu záporných nábojů.[9]

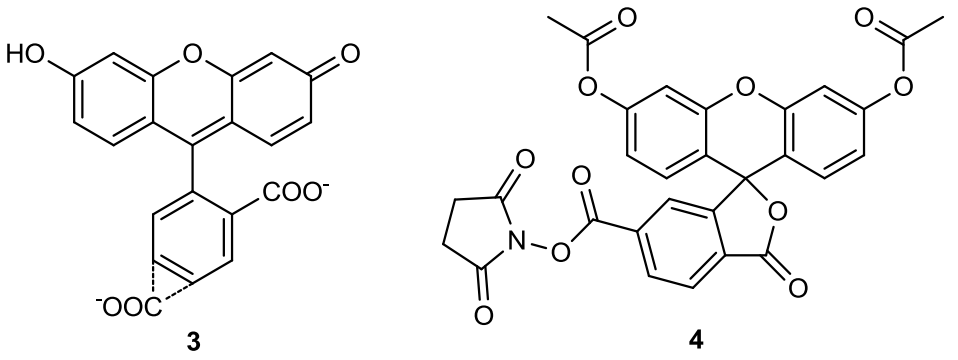


2

BCECF

Obrázek III: Struktura barviva BCECF.

Problém vymývání řeší 5- či 6-karboxyfluorescein **3** a jeho sukcimidyldiacetát **4** *(Obrázek IV)* případně fluorescein isothiokyanát, které uvnitř buňky nespecificky konjugují s přítomnými makromolekulami.[12]

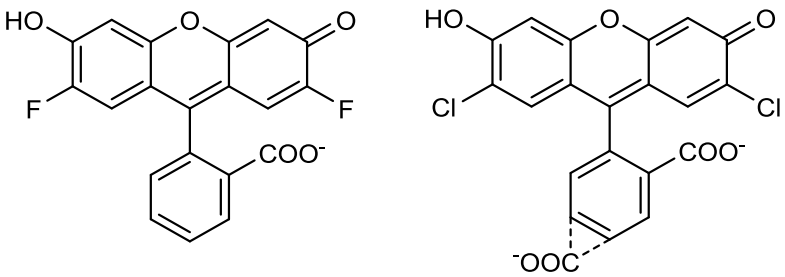


3 **4**

5(6)-karboxyfluorescein **sukcinimid-6-karboxyfluoresceindiacetát**

Obrázek IV: Struktury 5(6)-karboxyfluoresceinu a bezbarvé formy sukcinimid-6-karboxyfluoresceindiacetátu.

Podobné spektrální vlastnosti jako fluorescein mají i halogenované deriváty Oregon Green 488 **5** či 5(6)-karboxydichlorofluorescein (CDCF) **6** *(Obrázek V)*. V praxi se používají pro určení pH v závislosti na světle v acidických rostlinných kompartmentech.

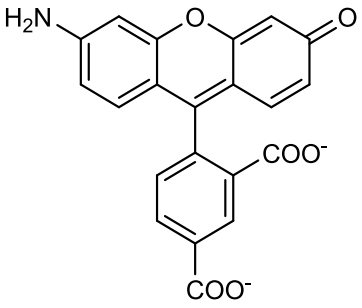


5
Oregon Green 488

6
CDCF

Obrázek V: Struktury barviv Oregon Green 488 a CDCF.

Fluorecein tvoří s rhodaminy hybridní sloučeniny zvané rhodoly **7** *(Obrázek VI),* které jsou celkově stabilnější. Tyto látky vypadají strukturně podobně jako rhodamin, přičemž jedna NR_2 skupina je nahrazena kyslíkem. Výhodou je vysoká molární absorptivita a s vhodnými *N*-substituenty i vysoké kvantové výtěžky v rozmezí 520 – 580 nm. V praxi se používá konjugát rhodolu s glykosylovaným steroidem pro měření pH u kardiální Na^+/K^+-ATP-syntházy.[13]



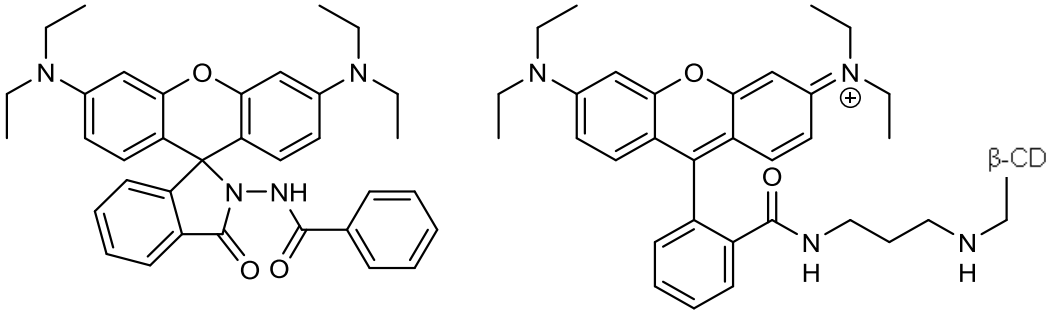
7
Rhodol

Obrázek VI: Struktura rhodolu.

Vysoké kvantové výtěžky, dobrou stabilitu a také dobrou permeabilitu přes membrány vykazují i rhodaminy. Jak již bylo řečeno, podle pH prostředí mění formu z bezbarvé spirocyklické na fluoreskující otevřenou formu. Na příklad u derivátu Rhodaminu B **8** *(Obrázek VII)* dochází v rozmezí pH 4,2 – 6,0 k více než stonásobné změně intenzity fluorescence.[11, 14]

Hasegawa a kolektiv modifikovali Rhodamin B β-cyklodextrinem β-CD **9**, kterým se značka připojuje k makromolekulám v cílových lysozomech.[15]

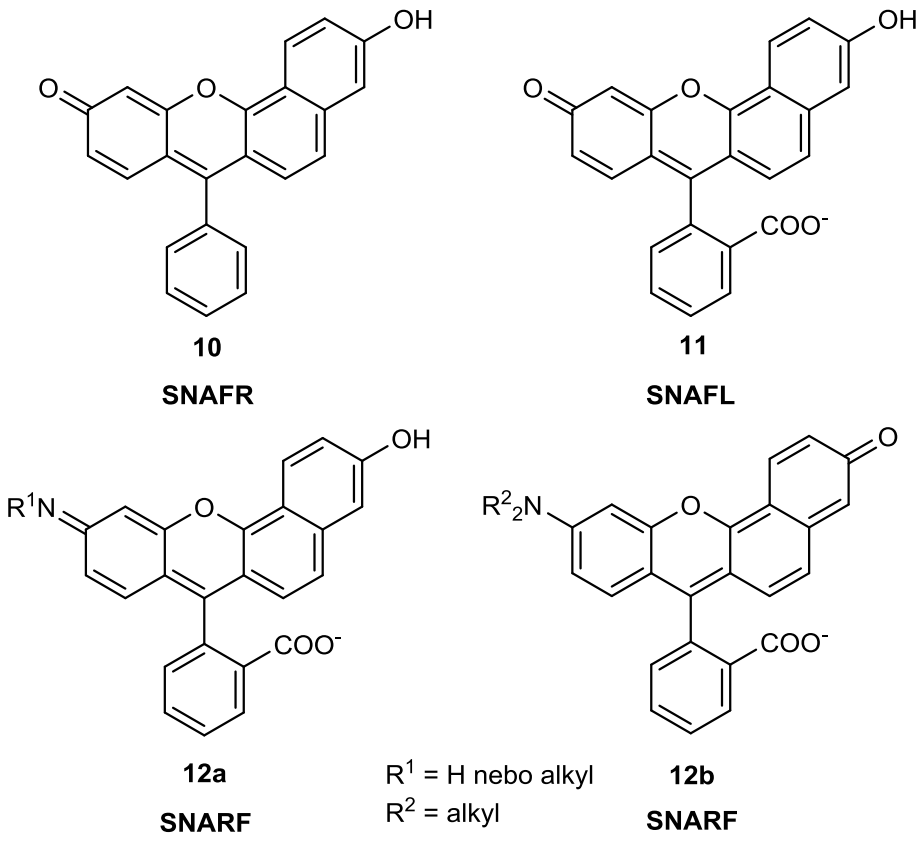
pH indikátory odvozené od rhodaminu jsou v Life Technologies nazývány pHrodo a v kyselém prostředí emitují jasně červené záření o vlnové délce 585 nm. Společnost uvádí možnost jejich použití například pro měření míry pohlcení apoptotických buněk makrofágy.[9]



Obrázek VII: Deriváty rhodaminu B.

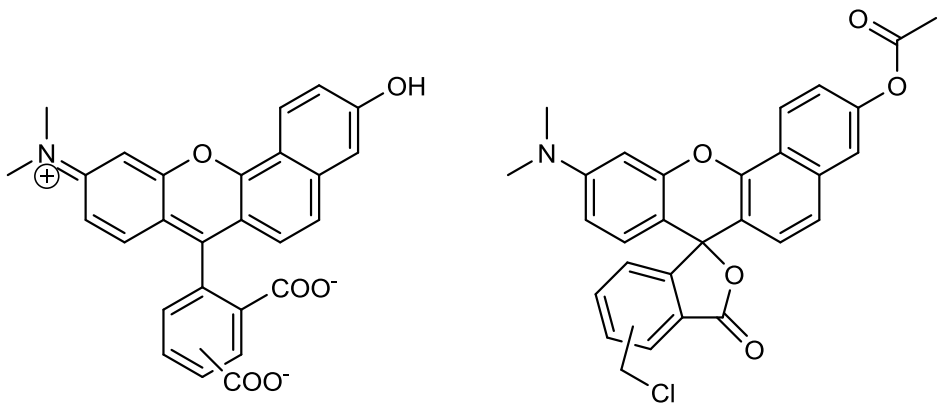
Další skupinou pH indikátorů jsou benzoxanthenová barviva jako například seminaftofluoron (SNAFR) **10**, seminaftofluorescein (SNAFL) **11** či seminaftorhodafluor (SNARF) **12a,b** viz *Obrázek VIII.* Centrální část struktury tvoří xanthen s přikondenzovaným benzenovým jádrem, různou kombinací N/O substituentů v poloze 3 a 10 a případnou karboxylovou skupinou v poloze 3‘.

SNARF **12** a SNAFL **11** indikátory emitují v protonované formě v rozmezí 540 - 580 nm a v bazickém prostředí v červené oblasti spektra mezi 620 a 640 nm.[7] Intracelulární pH se měří pomocí průtokové cytometrie či konfokální mikroskopie.



Obrázek VIII: Obecné struktury SNAFR, SNAFL a dvou typů SNARF.

Nejpoužívanějším benzoxanthenovým barvivem je karboxy-SNARF-1 (C.SNARF-1) **13** *(Obrázek IX).* Pro lepší permeabilitu do živých buněk se využívá chránění karboxylové skupiny AM (acetoxymethylem) nebo acetylem v případě OH skupiny. U déletrvajících studií pH se používá chloromethyl SNARF-1 acetát **14**, který pomalu reaguje s intracelulárními thiolovými skupinami za vzniku konjugátů.



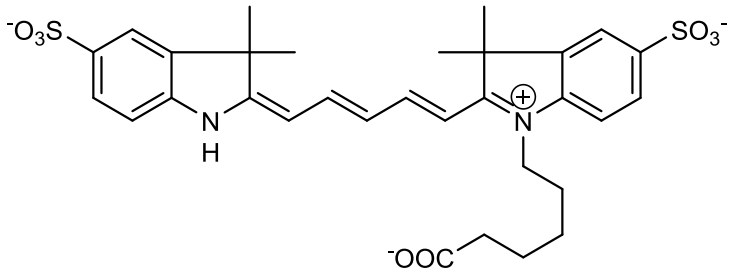
13 **14**

C.SNARF-1 **Chloromethyl SNARF-1 acetát**

Obrázek IX: Struktury barviv karboxy-SNARF-1 a chloromethyl-SNARF-1 acetát.

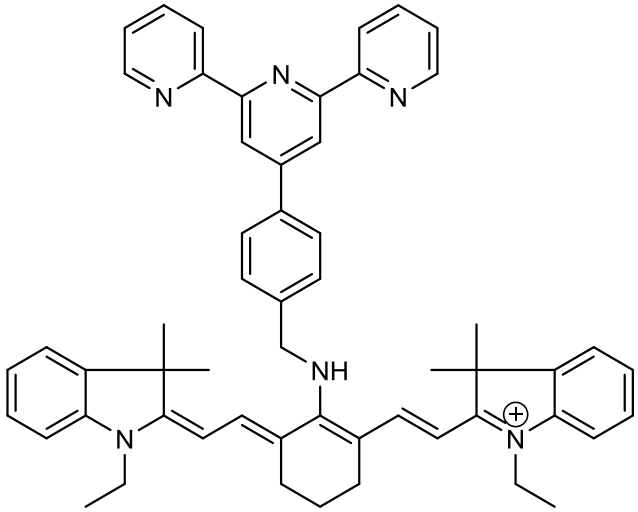
Spektrální vlastnosti nebývají ovlivněny ani koncentrací barviva, ani iontovou silou okolního prostředí, což jsou žádané vlastnosti všech intracelulárních indikátorů. Další výhodou C.SNARF-1 je delší excitační vlnová délka (514 či 536 nm), která není pro buňky tolik destruktivní.[7]

Cyaninová barviva tvoří další skupinu fluorescenčních pH indikátorů. Všechny deriváty absorbují i emitují záření v IČ oblasti spektra, což eliminuje poškození buněk i autofluorescenci. Nevýhodou je rychlejší vysvícení. Existují dva typy cyaninových barviv: na dusíku indolu nealkylované polymethinové struktury nebo modulátorem regulované trikarbocyaniny. V prvním případě dochází ke změně barvy protonací dusíku indolu, v druhém protonací dusíku modulátoru (na základě PeT = Photoinduced electron transfer)[11, 16, 17].



15

Cy-5



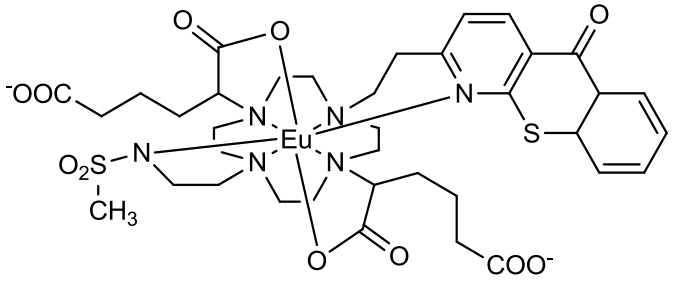
16

Cy-Tpy

Obrázek X: Struktury dvou typů cyaninových barviv, Cy-5 a Cy-Tpy.

Pro neutrální prostředí se používají pentamethin cyaninová barviva (např. Cyanin-5 **15**), která mají ideální vlastnosti pro měření malých změn intracelulárního pH *(Obrázek X)*. Rozpustnost ve vodném prostředí zajišťují sulfátové skupiny, které zároveň zabraňují agregaci. Konjugace s biomolekulami v buňce lze dosáhnout aktivací karboxylové skupiny pomocí *N*-hydroxysukcimidu. Indikátor trikarbocyanin obsahující modulátor 4‘-(aminomethylfenyl)-2,2‘:6‘,2‘‘-terpyridin (Tpy) **16** je používán v rozmezí pH 6,7 – 7,9 a vyznačuje se dobrou fotostabilitou, rozpustností ve vodě a nízkou cytotoxicitou.[7]

Mezi menší molekuly, které netvoří žádnou větší skupinu, můžeme zařadit komplex s europiem **17** *(Obrázek XI).* Sloučenina fluoreskuje v rozmezí 680 až 710 nm, přičemž v této oblasti je autofluorescence méně problematická. Při nižším pH dochází k uvolnění vazby *N*-Eu a také snížení intenzity fluorescence, která je v bazickém prostředí dost vysoká. Nevýhodou, jako u všech lanthanoidů, je relativně nízký kvantový výtěžek (0,06).

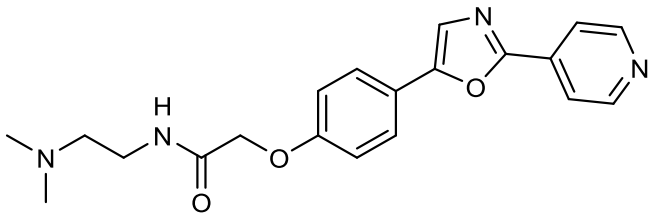


17

Europium komplex

Obrázek XI: Struktura komplexního barviva s europiem.

Indikátory vhodné pro měření nižšího pH jsou často nazývány lysosenzory podle kyselého prostředí lysozomů. Komerčně jich je mnoho dostupných u společnosti Life Technologies, přičemž nejlepší vlastnosti má Yellow/Blue DND-160 **18**, který má kvantový výtěžek přibližně 0,4 *(Obrázek XII)*.



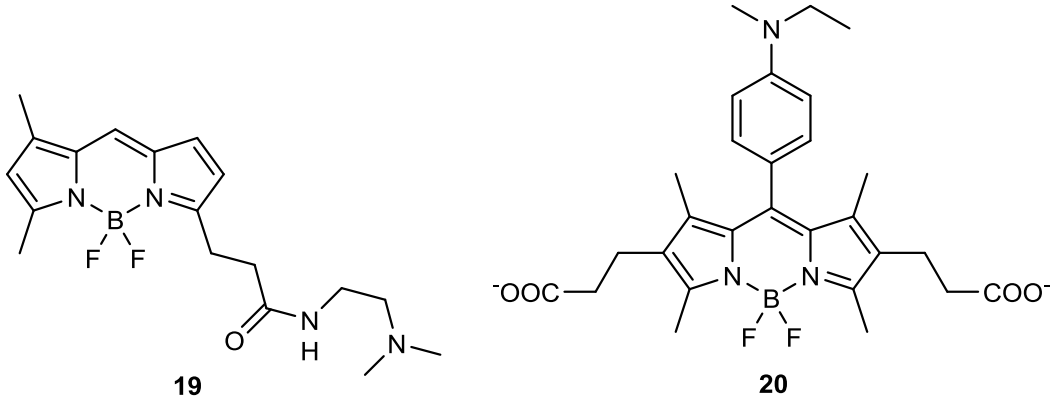
18

Yellow/Blue DND-160

Obrázek XII: Struktura barviva Yellow/Blue DND-160.

V kyselém prostředí indikátor fluoreskuje žlutě (542 nm) a v bazické formě modře (464 nm). Výhodou je dobrá fotostabilita a permeabilita, ale na druhou stranu může docházet k poškození buněk a autofluorescenci kvůli nízkým vlnovým délkám.[9]

Dobře permeabilní jsou i barviva odvozená od BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen), kterým se komerčně říká LysoTrackery. Na příklad můžeme uvést Green DND-26 **19**, který emituje ve vyšších vlnových délkách (511 nm) a používá se k zobrazování kyselých kompartmentů v živých buňkách. Jiné deriváty BODIPY (např. *N*-ethyl-methyl-BODIPY, EtMeNBDP **20**) se používají v konjugaci s monoklonální protilátkou trastuzumabem ke značení lysozomů v živých rakovinných buňkách *(Obrázek XIII)*.[9,18]



Obrázek XIII: Struktury dvou druhů barviv BODIPY.

V další části bych chtěla zmínit netradičnější způsoby značení organel a měření jejich pH. Indikátory intracelulárního pH mohou být navázány na určitém nosiči, který musí být schopen procházet membránou a nesmí být toxický. Výhodami nosičů je možnost navázání vícera indikátorů pro přesnější analýzy či větší stabilita než u některých organických molekul. V praxi se používají například polystyrenové mikročástice, bakteriofágové a fosfolipidové částice, kvantové body či silikonové nanočástice.[7]

Pro detekci pH v reálném čase jsou využívány polystyrenové mikrokuličky (cca 2 μm v průměru), které nesou aminohexanový linker s navázaným 5(6)-karboxyfluoresceinem **2**. Výhodou je dobrá permeabilita a netoxicita napříč různými koncentracemi.[19]

Cyaninová barviva mohou být navázána na bakteriofágových částicích o velikosti přibližně 880 x 6,6 nm. Obvykle se připojují 2 druhy barviv, závislé na pH a nezávislé. pH nezávislý indikátor zde slouží jako kalibrační kontrola. Pro kyselé prostředí se používá kombinace cyaninového barviva HCyV-646 a kontroly Cy-7.[20]

Fluorescenci závislou na pH lze měřit i u anorganických kvantových bodů složených ze selenidu kademnatého CdSe v jádře a obalů ze sulfidu zinečnatého ZnS a selenidu zinečnatého ZnSe. Povrch pokrytý kyselinou merkaptooctovou zvyšuje rozpustnost ve vodě. Fluorescence těchto bodů vzrůstá v bazickém prostředí. Výhodou kvantových bodů je jejich odolnost vůči vysvícení a jsou využívány pro dlouhotrvající analýzy intracelulárního pH např. u nádorových buněk vaječníku.[21]

Pro měření pH v lysozomech a endozomech se používají opět dvě barviva tentokrát uzavřená do silikonové nanočástice. pH závislý fluorescein a pH nezávislý tetramethylrhodamin vykazují v nanočástici lepší spektrální vlastnosti a jsou také stabilnější než volně v roztoku.[22]

Druhou možností je kovalentní vazba obou barviv na polystyrenovou částici pokrytou vrstvou fosfolipidu. Zamezí se tím možnému unikání barviva do okolního prostředí. Fosfolipidové kuličky se používají pro determinaci pH u myších makrofágů.[23]

Na konec se dostávám k fluorescenčnímu proteinu, který byl zmíněn v úvodu kapitoly. Zelený fluorescenční protein (GFP) se hojně používá v molekulární biologii jako reportérový gen a také jako marker biomolekul. Jasně zelenou barvu poskytuje fluorofor vytvořený autokatalytickou kondenzací tří aminokyselin (serin-tyrosin-glycin). Obal tvoří protein v podobě β-barelu, který svou hydrofobní a rigidní strukturou zvyšuje kvantový výtěžek chromoforu. Ve vodném prostředí je GFP silně závislý na pH prostředí a používá se k měření pH u specifických buněčných kompartmentů.

Největší výhodou zeleného fluorescenčního proteinu je možnost přesného zacílení na proteiny organel, ať už se jedná o cytosol, jádro, mitochondrie či endoplasmatické retikulum. Vysoká specifičnost ale vyžaduje enormní spoustu práce se zakorporováním genu do buňky, a proto se k obyčejným laboratorním měřením nepoužívá.[24]

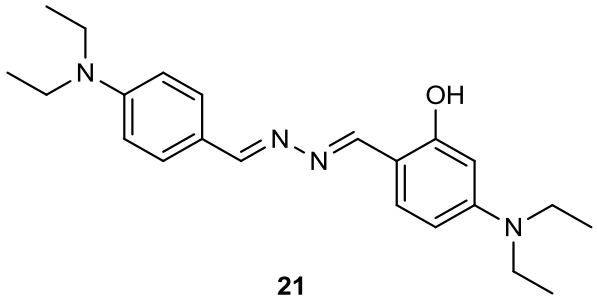
ii. Multifunkční sondy

Kvůli toxicitě většiny iontů těžkých přechodných kovů se vyvíjely senzory selektivní ke každému jednotlivému prvku. V některých případech intoxikace organismu či kontaminace prostředí je příčinou více těchto iontů. Kvůli možnému synergistickému působení by bylo vhodné měřit tyto infektanty zároveň. Proto se vědci v poslední době zaměřují na vývoj nových multifunkčních sond, které by toho byly schopné. Víceúčelové sondy jsou vyvíjeny především pro anorganické ionty a v této kapitole jsou shrnuty některé z nich.[25]

Přechodné kovy typu Cu^{2+} a Fe^{3+} jsou pro organismus nezbytné, ale jejich nadbytek může způsobit nejrůznější onemocnění jako např. Wilsonovu chorobu, nervové onemocnění či dokonce smrt v případě měďnatých iontů. Příliš vysoká koncentrace železitých iontů zase může vyvolat konjunktivitidu (zánět spojivek) či retinitidu (zánět sítnice).[26] Chromité

ionty zlepšují metabolismus glukózy a lipidů, přičemž příjem Cr^{3+} iontů vyšší než 25-35 mg za den může způsobit poškození buněčné struktury.[27] Fluoridy hrají zásadní roli v oblasti zubů, kostí a v léčbě osteoporózy. Nadbytek ničí zubní sklovinu a dochází k fluoróze, nefrotoxickým změnám či močovým kamenům.[28] Dlouhodobější vystavení se rtuťnatým iontům přináší nejčastěji nervová onemocnění, nespavost, třes až úplnou otravu.[28]

S. Dalapati et al. vyvinuli senzor pro Cu^{2+} a Fe^{3+} ionty na bázi (5-diethylamino-2-[(4-diethylamino-benzylidene)-hydrazonomethyl]-fenolu **21** *(Obrázek XIV)*, kterým lze tyto ionty detekovat pouhým okem.

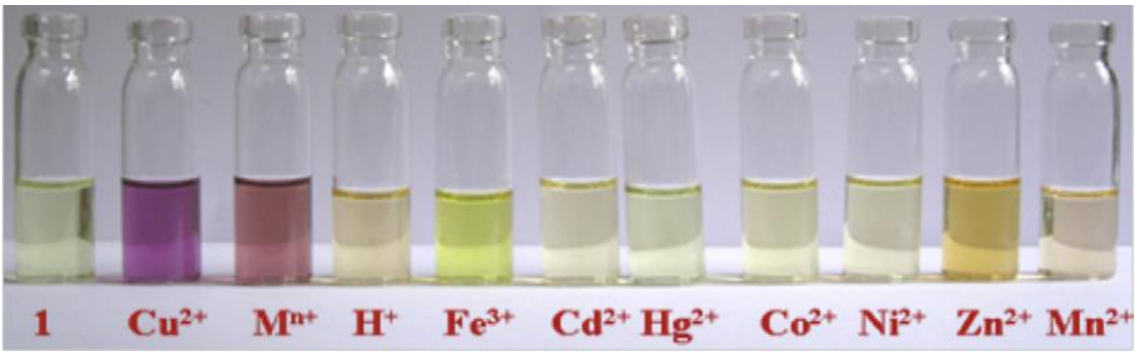


21

(5-diethylamino-2-[(4-diethylamino-benzyliden)-hydrazonomethyl]-fenol

Obrázek XIV: Struktura multifunkční sondy pro Cu^{2+} a Fe^{3+} ionty.

21 rozpuštěný v acetonitrilu (číslo **1** *v obrázku číslo XV)* se po přidání 2 ekvivalentů měďnatých iontů zbarví do jasně fialové barvy, zatímco železité ionty barví roztok světle žlutě. Ostatní přechodné kovy poskytují odstíny světlehnědé. Zajímavé je, že směs obsahující jak Cu^{2+} a Fe^{3+} ionty, tak jakékoli jiné (v obrázku $\mathbf{M^{n+}}$), mění barvu roztoku na jedinečnou červenou.

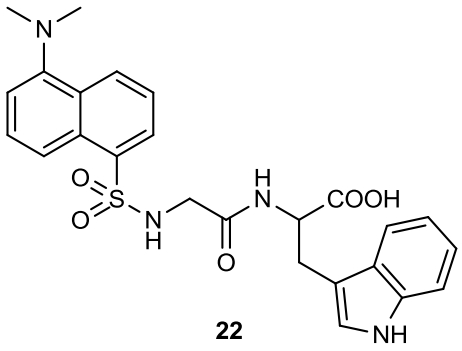


Obrázek XV: Barevné změny roztoku senzoru a kovových či vodíkových iontů.[26]

Levá část molekuly s diethylaminem tvoří vazebné místo pro Fe^{3+} ionty a Cu^{2+} jsou zachytávány diethylaminem ve spojení s -OH skupinou. Limit detekce tohoto multifunkčního senzoru je 0,4 μM.[26]

Další multifunkční sondy jsou vyvíjeny na bázi dipeptidu s navázaným dansyl zbytkem 2-(2-(5-(*N*,*N*-dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido)acetamido)-3-(1H-indol-3-yl) propanová kyselina, Dansylglycinyl-L-tryptofan, DGT **22** *(Obrázek XVI).* Tato látka dokáže identifikovat Hg^{2+} a Cu^{2+} ionty, je senzitivní ke změnám pH v rozmezí 2,0 až 5,0 a zároveň se v přítomnosti Pb^{2+} iontů mění na sraženinu.[25]

V přítomnosti zmíněných iontů dochází ke změně absorpčního a emisního spektra a je zapotřebí používat UV-VIS detektor. V případě sraženiny olovnatého komplexu se využívá turbidimetrie.



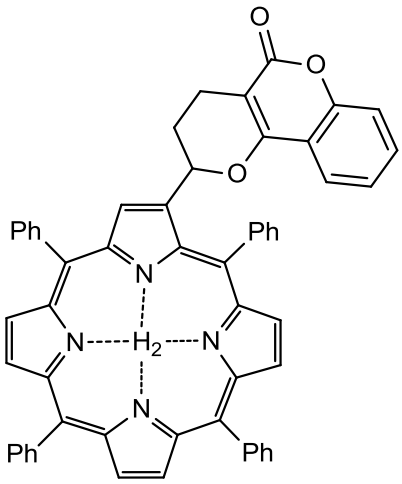
22

Dansylglycinyl-L-tryptofan

Obrázek XVI: Struktura multifunkční sondy DGT.

Portugalští vědci zase připravili multifunkční senzory odvozené od porfyrinu s navázaným kumarinem **23** *(Obrázek XVII).* Kumarin zlepšuje rozpustnost látky v polárnějších rozpouštědlech a porfyrinové jádro tvoří vazebné místo pro ionty.

Tato sloučenina **23** je schopná určit koncentraci Hg^{2+} iontů, přičemž kolorimetrická změna emisního spektra je rozeznatelná lidským okem. Navíc velmi nízké pH (okolo 0,8-1,0) poskytuje jasně zelené zbarvení roztoku, zatímco v kyselejším pH dochází ke změně na žlutou barvu.[29]

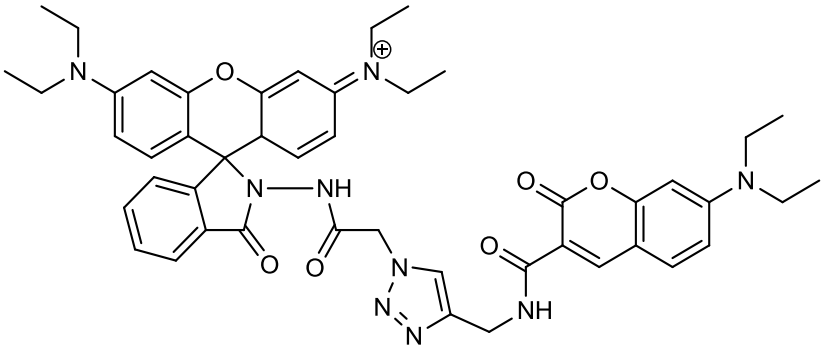


23

Porfyrin-kumarin

Obrázek XVII: Struktura multifunkčního senzoru na bázi Porfyrin-kumarin.

Kumarin ve spojení s Rhodaminem B byl použit i u sondy **24** selektivní pro Cu^{2+}, Fe^{3+} a Cr^{3+} ionty. [27] Tyto dva dobře fluoreskující zbytky jsou spojeny triazolovým linkerem, jak je možno vidět *na obrázku č. XVIII.*

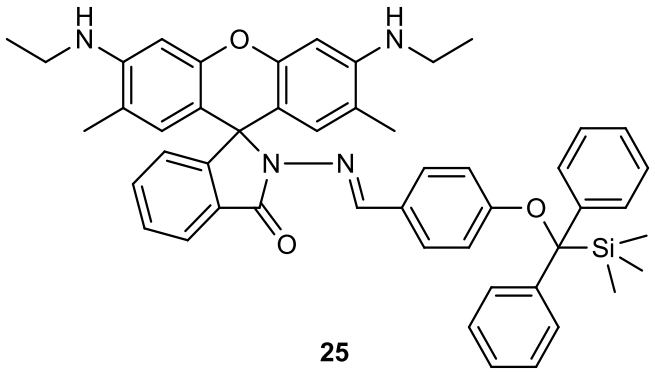


24

Rhodamin B-kumarin

Obrázek XVIII: Struktura multifunkční sondy na bázi Rhodaminu B a kumarinu.

Pro detekci rtuťnatých a fluoridových iontů byl vyvinut senzor **25** na bázi Rhodaminu 6G *(Obrázek XIX)*. Rozlišit pozitivní reakci od negativní lze pouhým okem, kdy v přítomnosti Hg^{2+} dochází k zrůžovění roztoku s **25** a důsledkem desilylace v přítomnosti F^- iontů roztok nabyde žlutou barvu.[28]



25

Silylovaný derivát rhodaminu

Obrázek XIX: Struktura derivátu rhodaminu 6G.

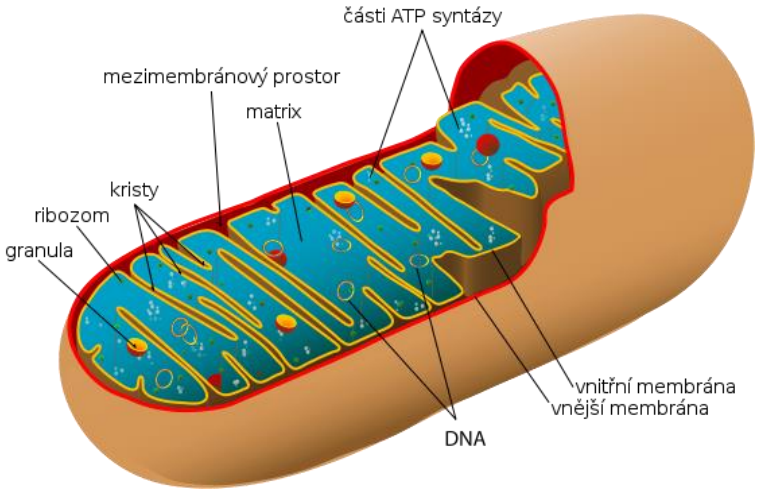
Vývoj dalších multifunkčních senzorů je předmětem výzkumu mnoha dalších vědeckých pracovníků. Je otázkou času, kdy budou dostupné multisondy pro jakékoli kombinace iontů.

II. ZNAČENÍ MITOCHONDRIÍ

Ve většině eukaryotních buněk můžeme nalézt mitochondrie zajišťující mnoho životně důležitých reakcí. Jednou z úloh těchto membránových organel je metabolismus sacharidů, lipidů a aminokyselin. Dále obsahuje enzymy citrátového cyklu, je centrem β-oxidace mastných kyselin a ketogeneze a především dýchacího řetězce a syntézy ATP, která bude popsána dále. [30, 31]

Mitochondrie jsou bakteriálního původu a některé enzymy potřebné k jednotlivým reakcím se syntetizují podle vlastní mitochondriální DNA. Ostatní proteiny, kterých je většina, musí být vyrobeny v cytosolu a poté mnoha transportními proteiny přeneseny do mitochondrie. Tyto bílkoviny jsou rozeznávány pomocí speciální signální sekvence na N-konci, která je po transportu odštěpena.

Tvar a stavba mitochondrie je velmi různorodá. Morfologie organely může být ovlivněná jak metabolickým stavem buňky, buněčným cyklem či diferenciací buňky, tak i patologickými stavy. V dělících se buňkách mění tvar z vícera oválných, který se vyskytuje ve většině publikací *(Obr. č. XX)*, na jediný vláknitý a rozvětvený. Změny v morfologii mitochondrií jsou kontrolovány souborem proteinů, jež způsobují štěpení i splynutí mitochondriální hmoty. Mutace v těchto proteinech můžou postihnout komponenty dýchacího řetězce nebo oxidativní fosforylace a způsobit nemoci typu laktátová acidóza, myopatie či encefalopatie. [9, 32]



Obrázek XX: Stavba mitochondrie.[36]

Tvar mitochondrie je zároveň kontrolován i aparátem cytoskeletu, tzn. aktinovými filamenty a mikrotubuly buňky. V nedělící se buňce dost záleží na typu buňky.

Různí se i množství mitochondrií v jednotlivých buňkách. Určující je energetická hladina a druh buňky, stádium buněčného cyklu a proliferace. V hnědých adipozních buňkách[33], hepatocytech[34] a v určitých renálních epitelových buňkách[35] bývá aktivita mitochondrií vyšší než například u klidových imunitních buněk. Markantně snížený počet mitochondrií bychom mohli najít u lidí trpících Alzheimerovou chorobou.[8,9]

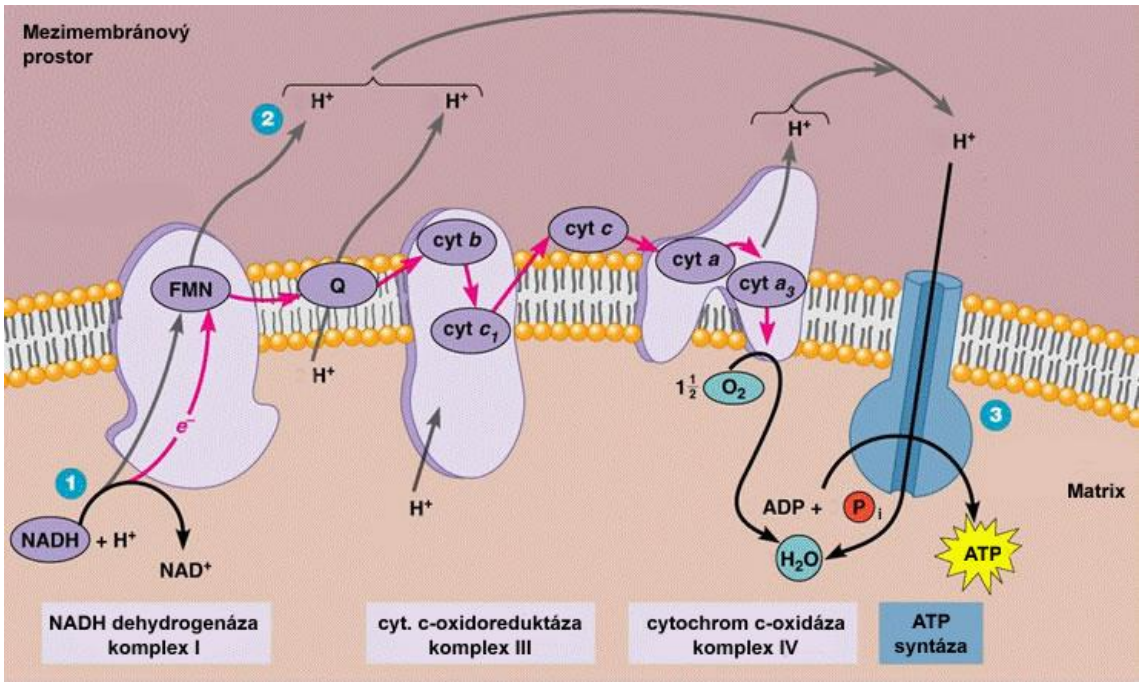
Mitochondrie má nejčastěji oválný, vejcovitý tvar, jehož povrch je pokryt vnější membránou propustnou pro většinu metabolitů. Vnitřní membrána je selektivně permeabilní, uzavírá matrix a navíc tvoří tzv. kristy, které zvětšují prostor pro membránové enzymy. Je tvořena především fosfolipidem kardiolipin, který nese 4 mastné kyseliny. Na této membráně jsou uchyceny enzymy dýchacího řetězce, ATP-synthasa a různé membránové přenašeče (TIM komplex = translocase of the inner membrane). V mezimembránovém prostoru bychom našli adenylátkinasu a kreatinkinasu. Na povrchu mitochondrie se vyskytuje mnoho různých enzymů, například acyl-CoA-synthasa, glycerolfosfátacyltransferasa a další přenašeče (TOM komplex = translocase of the outer membrane).[30]

Matrix je hustá hmota uvnitř mitochondrie, která obsahuje méně než 50 % vody. Hlavní složkou jsou bílkoviny, především enzymy Krebsova cyklu, dále nukleotidové koenzymy, anorganické ionty (vápník) a mitochondriální DNA.[36] Některé důležitější enzymy včetně jejich biochemických vztahů jsou shrnuty v následující kapitole.

O možnostech barvení mitochondrií bude pojednávat kapitola ii. Vlastnosti sond specifických pro mitochondrie.

i. Funkce mitochondrií v lidském těle

Klíčovou funkcí mitochondrií je produkce energie prostřednictvím dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace. Téměř veškerá energie uvolněná oxidací cukrů, mastných kyselin a aminokyselin se vyskytuje uvnitř mitochondrií v podobě redukčních ekvivalentů (H nebo elektronů). Právě dýchací řetězec sbírá a transportuje tyto ekvivalenty směrem ke konečné reakci s kyslíkem, ve které dochází ke vzniku vody v procesu oxidativní fosforylace. Uvolněná energie se poté skladuje v podobě vysoce energetických fosfátů (ATP). [30]



Obrázek XXI: Schéma elektronového transportu a oxidativní fosforylace.[37]

Všechny důležité proteiny dýchacího řetězce jsou zakotveny ve vnitřní mitochondriální membráně v podobě čtyř velkých proteinových komplexů *(Obr. č. XXI)*. Komplex 1, NADH-Q-oxidoreduktáza, přenáší elektrony z NADH (redukovaný nikotinamidadenindinukleotid) na ubichinon (koenzym Q). Dochází k přenosu 4 H^+ přes membránu, jak je vidět na rovnici:

$$NADH + Q + 5H^+_{matrix} \rightarrow NAD + QH_2 + 4H^+_{mezimembránový\ prostor}$$

Elektrony jsou nejdříve přeneseny z NADH na FMN (flavinmononukleotid), který může přijmout dva elektrony nebo také jeden za vzniku semichinonu. Cesta z FMN vede přes tzv. FeS centra, což jsou sloučeniny nehemového železa kovalentně vázajícího atomy anorganické síry. Nosičem těchto center bývá protein bohatý na cystein. Železo a síra se účastní jedné reakce zajišťující přenos elektronů, při které mocenství železa prochází oxidoredukcí a kolísá mezi Fe^{2+} a Fe^{3+}. S ohledem na zaměření mé diplomové práce, jsem rozkreslila možnosti vazeb železa v FeS-proteinech *na schématu č. II.*[30]

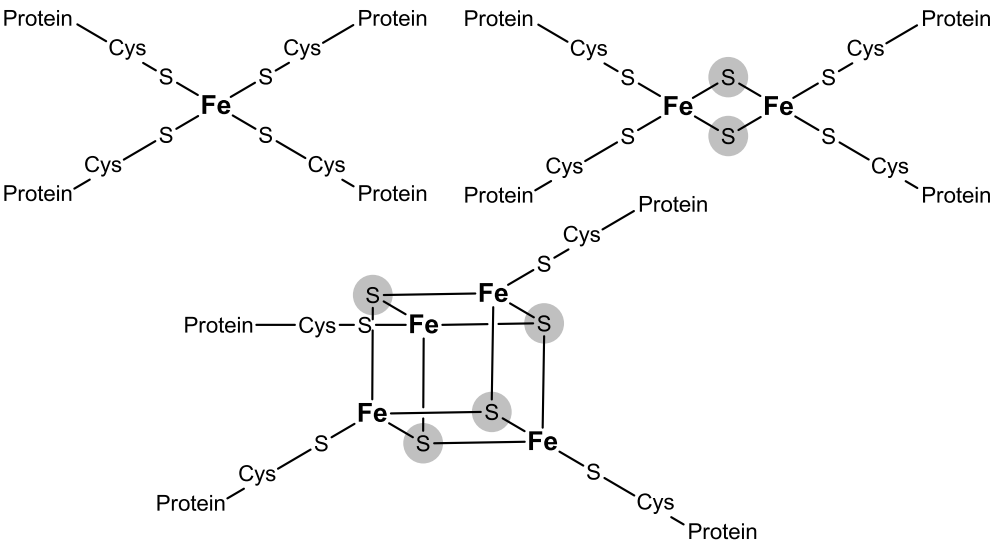


Schéma II: Fe-S proteiny.

V dalším kroku elektronového transportu jsou elektrony přeneseny z QH_2 na cytochrom c prostřednictvím komplexu III (Q-cytochrom c-oxidoreduktáza).

$$QH_2 + 2\ Cyt\ c_{oxidovaný} + 2H^+_{matrix} \rightarrow\ Q + 2\ Cyt\ c_{redukovaný} + 4H^+_{mezimembránový\ prostor}$$

Využívají se zde cytochromy c_1 a b_1 a k oxidaci jednoho chinolu QH_2 je zapotřebí zredukování dvou cytochromů c.[30]

V komplexu IV (cytochrom c-oxidáza) dochází k oxidaci redukovaného cytochromu c, přičemž se O_2 redukuje na dvě molekuly vody.

$$4\ Cyt\ c_{redukovaný} +\ O_2 + 8H^+_{matrix} \rightarrow\ 4\ Cyt\ c_{oxidovaný} +\ 2H_2O + 4H^+_{mezimembránový\ prostor}$$

Uvolnění 4 elektronů z cytochromu c a jeho převedení na O_2 umožňují dvě hemové skupiny a měď. Nejprve přijme elektrony Cu centrum (Cu_A), které obsahuje dva atomy mědi spojené proteiny s volnými –SH skupinami cysteinu. Dále pokračují přes obě hemové skupiny k druhému Cu_B centru a na konec k O_2. Molekuly kyslíku zůstávají vázány na komplex IV, dokud nedojde k úplnému zredukování na vodu. Tímto se minimalizuje riziko uvolnění nežádoucích meziproduktů, jako jsou superoxidové anionty nebo peroxidy, které jsou tvořeny, když O_2 přijímá jen jeden nebo dva elektrony.

Závěrečným krokem tvorby vysokoenergetických ATP je přechod protonů H^+ zpět do matrix mitochondrie skrz ATP-syntázu. Oxidativní fosforylace je založena na teorii

chemiosmózy, kterou navrhl Peter Mitchell v roce 1961.[38] Podle něj řídí mechanismus syntézy ATP hybná síla protonů H^+, způsobená rozdílem elektrochemických potenciálů (negativní na straně matrix, pozitivní v mezimembránovém prostoru). Vnitřní mitochondriální membrána je, jak už bylo uvedeno, selektivně propustná, tudíž se protony na vnější straně hromadí.

ATP-syntáza je protein složený z mnoha podjednotek. Část F_0 vede přes membránů a tím vytváří kanál pro průchod protonů. Raménkem se pojí se statickou F_1 částí enzymu, která je pevně připojena k membráně. Transportem protonů kanálem zpět do matrix dochází k roztočení F_0 podjednotky, což zapříčiní střídající se změnu konformace F_1 a předání vazebné energie ADP na tvorbu konečného produktu, ATP.

Podobným způsobem, jako je syntéza ATP, dochází v hnědé adipozní tkáni k termoregulaci organismu. Vodíkové kationty v tomto případě prochází membránovým enzymem thermogenin (uncoupling protein 1, UCP1), který vyprodukuje teplo.[39]

Mitochondrie dále podobně jako endoplazmatické retikulum uchovávají vápenaté ionty pro pozdější použití a tím udržují homeostázu buňky. Fungují vlastně jako takový kalciový pufr. Koncentrace vápníku v cytosolu reguluje mnohé reakce, je důležitá pro přenos signálů a také pro uvolnění neurotransmiterů v neuronech či hormonů v endokrinních buňkách.[40] Dovnitř se Ca^{2+} ionty dostávají díky membránovému potenciálu speciálním kalciovým přenašečem. Zpět do cytosolu jsou poté vypouštěny pomocí Na^+/Ca^{2+} transportním proteinem.[41]

Uvnitř mitochondrií se vyskytují i spouštěcí mechanismy apoptózy (programované smrti buňky). Po vypuštění signálu buněčné smrti dochází k aktivaci kaspázové dráhy a k úplnému zneškodnění buňky beze zbytků, které by mohly způsobit zánětlivou reakci.[42]

V buňce je mnoho zdrojů reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) a jedním z nich jsou i mitochondrie. ROS nemusí být jen škodlivé, ale mohou se účastnit redox signalizačních pochodů.[43] Nadbytek ROS způsobuje různé mitochondriální nemoci.[8]

Dále v mitochondriích dochází i k částečné syntéze hemu (porfyrinů) z kyseliny 5-aminolevulové[44] a také k Ca^{2+}-indukované syntéze steroidů.[45]

Nakonec bych chtěla zmínit funkci membránového potenciálu,[36,46] který je udržován generováním vodíkových iontů enzymatickými komplexy směrem

do mezimembránového prostoru.[47] Membránový potenciál je vlastně napětí na polarizované polopropustné membráně a je mimo jiné používán k buněčné komunikaci. Ke stanovení membránového potenciálu se používají právě rhodaminová barviva, která budou probrána v následující kapitole.

Jak již bylo řečeno, mitochondrie jsou zásadní v mnoha důležitých biologických procesích buňky, které jsou navzájem provázané. Poškození jedné části biochemického cyklu může vést k dalším i závažnějším nemocem. Například snížením nebo absencí většiny oxidoreduktáz dýchacího řetězce vzniká onemocnění známé jako fatální infantilní mitochondriální myopatie a renální dysfunkce[30].

Dále mitochondriální encefalopatie, laktátová acidóza a iktus (zkráceně MELAS)[30] je dědičná nemoc způsobená deficitem NADH-Q-oxidoreduktázy nebo cytochromoxidázy (komplexy I a IV). Dochází k ní po mutaci v mitochondriální DNA a může být zapojena do patogeneze Alzheimerovy choroby nebo diabetes mellitus.[8]

Biochemické procesy v mitochondriích mohou být potlačeny mnoha jedy či inhibitory, čehož bylo využito v počátcích biologického výzkumu. Například barbituráty inhibují přenos elektronů přes komplex I tím, že blokují přenos z FeS na Q. Ve vyšší dávce může být podání barbiturátů fatální. Mezi klasické chemické jedy lze zařadit H_2S, oxid uhelnatý a kyanidy, které inhibují komplex IV a zcela zastavují dýchání. Antibiotikum oligomycin zase zcela zabraňuje oxidaci a fosforylaci tím, že blokuje tok protonů přes ATP-syntázu.

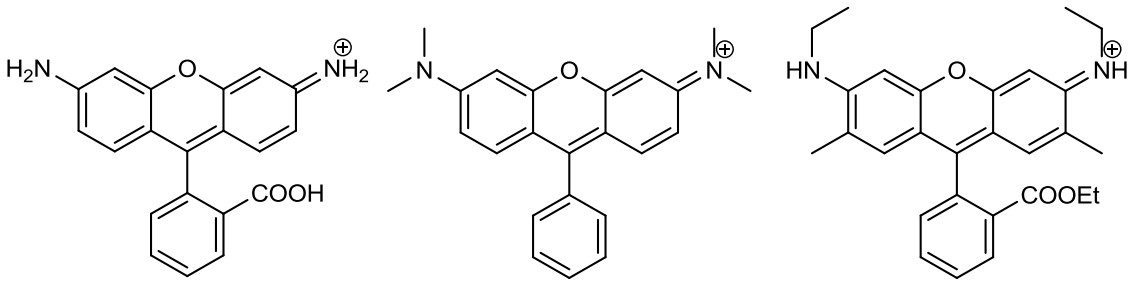
Další skupinou jsou takzvané odpojovače, které odpojují oxidaci v dýchacím řetězci od fosforylace. Ve výsledku dojde k nekontrolovatelnému dýchání, jelikož koncentrace fostátu a ADP již není určující pro rychlost reakce. V laboratoři se nejčastěji používá 2,4-dinitrofenol, v přírodě takto funguje protein thermogenin, který vytváří teplo u kojenců či hibernujících zvířat. [30]

ii. Vlastnosti sond specifických pro mitochondrie

Mitochondrie je třeba barvit z různých biomedicínských důvodů. Může se jednat o výzkum morfologie organely a její lokalizaci[32], či detekce membránového potenciálu[48, 49], apoptózy[50] a distribuce vápenatých kanálů.[51]

Mezi tradiční mitochondriální barviva patří bezpochyby rhodaminy a rosaminy *(Obr. XXII).* Rhodamin 123 **26** dobře prochází přes membránu, rychle se v mitochondriích zachytí a nevykazuje přílišnou cytotoxicitu, přesto se ale nedá použít ve všech případech značení mitochondrií. Jeho nevýhodou, podobně jako u dalších rhodaminových barviv, je vymývání z buňky po depolarizaci membrány.[9, 32]

Podobně se chová i Tetramethylrosamin **27** či Rhodamin 6G **28**, které se využívají u MDR buněk (multidrug resistence) či k měření membránového potenciálu.



26 **Rhodamin 123** **27** **Tetramethylrosamin** **28** **Rhodamin 6G**

Obrázek XXII: Přehled rhodaminových barviv.

Problém vymývání značek z buňky, zejména po fixaci aldehydovými činidly, lze řešit kovalentním připojením barviva k thiolovým skupinám v mitochondrii. Matrix mitochondrií je na volné SH skupiny v proteinech opravdu bohatá. Běžně se koncentrace pohybují mezi 20 – 40 mM.[52]

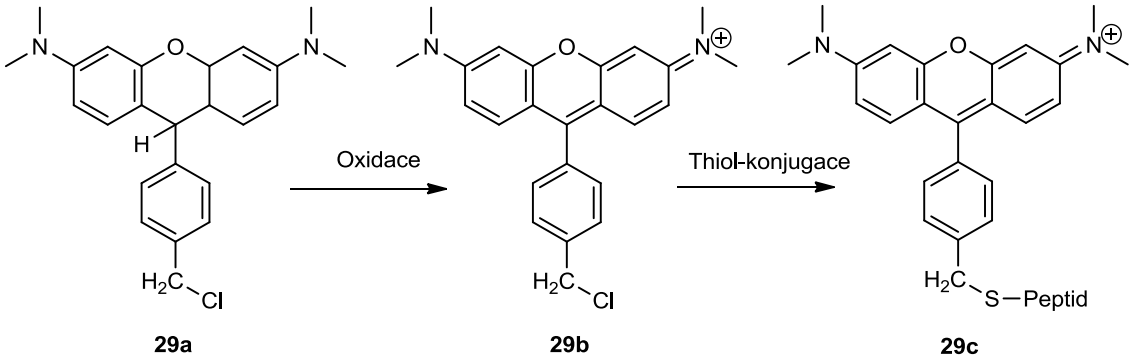
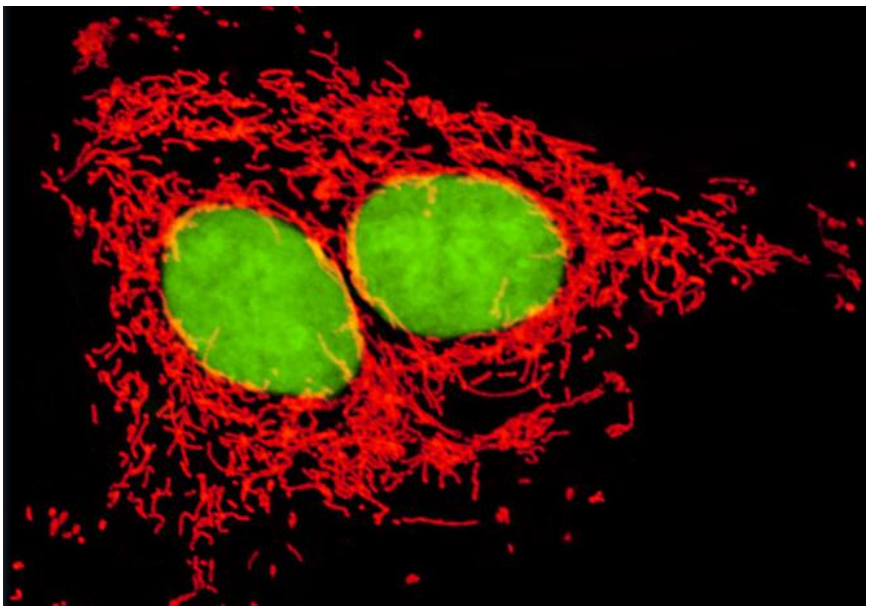


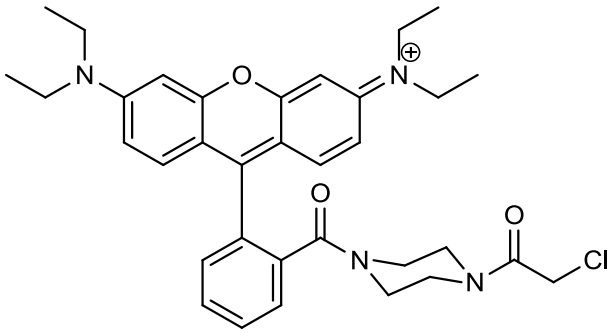
Schéma III: Vazba MitoTrackeru Orange CMTMRos k proteinu.

Společnost Life Technologies prodává tzv. MitoTrackery, které jsou odvozené od rhodaminu či rosaminu a navíc obsahují chlormethylový zbytek **29a**. Právě tato reaktivní skupina je zodpovědná za déletrvající barevnost buněk po aplikaci fixačních činidel na bázi aldehydu *(Schéma III).* MitoTracker Orange CMTMRosamine fluoreskuje při 576 nm, a proto se dobře kombinuje s jinými zelenými barvivy v rámci vícebarevného značení *(Obrázek XXIII).*[9]



Obrázek XXIII: Ukázka barvení GeLu buněčné linie. Červeně síť mitochondrií zvýrazněná s pomocí MitoTracker Orange, jádro SYTOX Green.[53]

Shugi Wu a spol.[54] připravili a otestovali podobnou látku na bázi rhodaminu B, která obsahuje (2‘-chloroacetyl)piperazinamid **30** *(Obrázek XXIV).* Toto barvivo má být levnější než MitoTrackery a zároveň se stejnými fluorescenčními vlastnostmi.



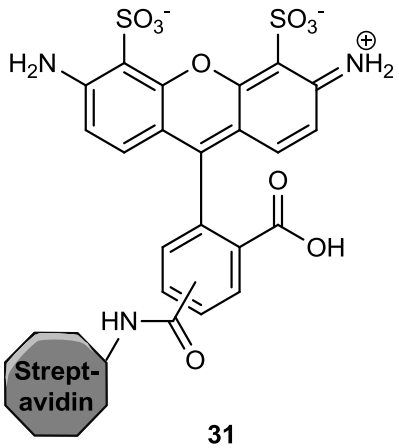
30

RB-CAP

Obrázek XXIV: Struktura derivátu rhodaminu B RB-CAP.

Komerčně dostupné jsou mimo jiné barviva s vyšší excitační vlnovou délkou, která nezpůsobuje poškození buněk a zabrání se tím i autofluorescenci některých biologických tkání. Na příklad můžu uvést MitoFluor Red 589 a MitoFluor Far Red 680, což jsou sondy vhodné pro měření membránového potenciálu. MitoFluor Red 589 se akumuluje v mitochondrii bez ohledu na polarizaci membrány, čímž je vhodným barvivem pro živé i fixované buňky. Barvivo MitoFluor Far Red není viditelné přímo a k jeho zobrazení je nutné použít detektor pro infračervené záření (např. CCD kamera). Ani jedna sonda neobsahuje reaktivní chlormethylovou skupinu.[9]

Mitochondrie je jediným místem, kde dochází k syntéze biotinu, a proto lze využít silné afinity avidinu k biotinu. Připojením téměř jakéhokoli barviva k avidinu či streptavidinu dojde k selektivnímu obarvení organely. V praxi se používá například Alexa Fluor 488 streptavidin **31** *(Schéma XXV)*.



31

AlexaFluor 488 - Streptavidin

Obrázek XXV: Konjugát barviva AlexaFluor 488 a streptavidinu.

Jak již bylo řečeno, životně důležitý proces oxidativní fosforylace probíhá v mitochondriích. Zapotřebí je 5 membránových proteinových komplexů, přičemž ke každému z nich již byla vyvinuta vhodná protilátka. Stupeň exprese těchto proteinů se sleduje pomocí metody Western blottingu či imunohistochemicky. Odhalení změn v komplexech oxidativní fosforylace je důležité pro léčbu Alzheimerovy nebo Parkinsonovy nemoci. Přehled dostupných monoklonálních protilátek je k dispozici na webu Life Technologies.[9]

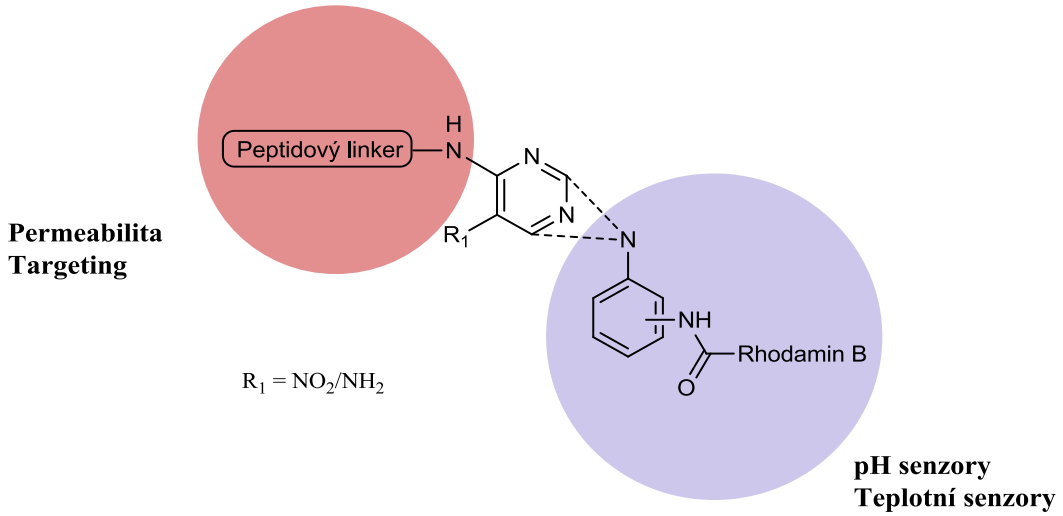
VÝSLEDKY A DISKUZE

Již v úvodu bylo zmíněno, že cílem této diplomové práce je syntéza pyrimidinů, ke kterým je přes fenylendiaminový linker vázaný Rhodamin B, barvivo vykazující vhodné vlastnosti pro značení mitochondrií.

Na *obrázku č. 1* lze vidět strukturu, která byla předlohou pro tuto diplomovou práci.

Systém obsahuje centrální pyrimidinové jádro, které lze snadno modifikovat ve třech pozicích. Jedna z pozic slouží k zavedení peptidového linkeru pro zlepšení permeability látky přes membránu, popř. zacílení molekuly (červeně zvýrazněná část molekuly). Druhá pozice nese diaminový linker, ke kterému je kovalentně vázáno fluorescenční barvivo (fialově zvýrazněná část molekuly). V poslední pozici je nitro skupina, která jednak usnadňuje substituci dvou výše zmíněných pozic a také může být následně převedena na aminoskupinu a zavést do molekuly další prostor pro modifikaci.

Problémem těchto látek je jejich vymývání z buňky po aplikaci fixačních činidel (fixace buňky = konzervace nebo usmrcení buňky za účelem zachování její přirozené podoby).[9] Řešení by mohlo být navázání halogenovaného zbytku podobně jako u MitoTrackerů (viz *Schéma II* teoretické části), případně začlenění cysteinu do peptidového linkeru. Tímto způsobem by se pak značka kovalentně navázala (alkylací –SH skupin cysteinu v případě halogenovaných derivátů nebo tvorbou disulfidické vazby v případě derivátů obsahujících cystein) uvnitř mitochondrií.



Obrázek 1: Struktura výchozích molekul.

K syntéze cílových molekul byla použita syntéza na pevné fázi. V prvním kroku byl na Wangovu pryskyřici navázán peptidový linker **1.** Na ten byl v dalším kroku navázán dichloro-5-nitropyrimidin, který byl poté substituován fenylendiaminem. Následný coupling s Rhodaminem B poskytl sloučeniny **4**, které byly po redukci nitro skupiny acylovány 4-fluor-3-nitrobenzoovou kyselinou za vzniku finálních derivátů **6**.

Záměr diplomové práce lze shrnout do reakčního *schématu číslo 1*.

Přehled číslování všech látek odvozených od linkeru 1 a 2 je znázorněn na *schématu č. 2 a 3*.

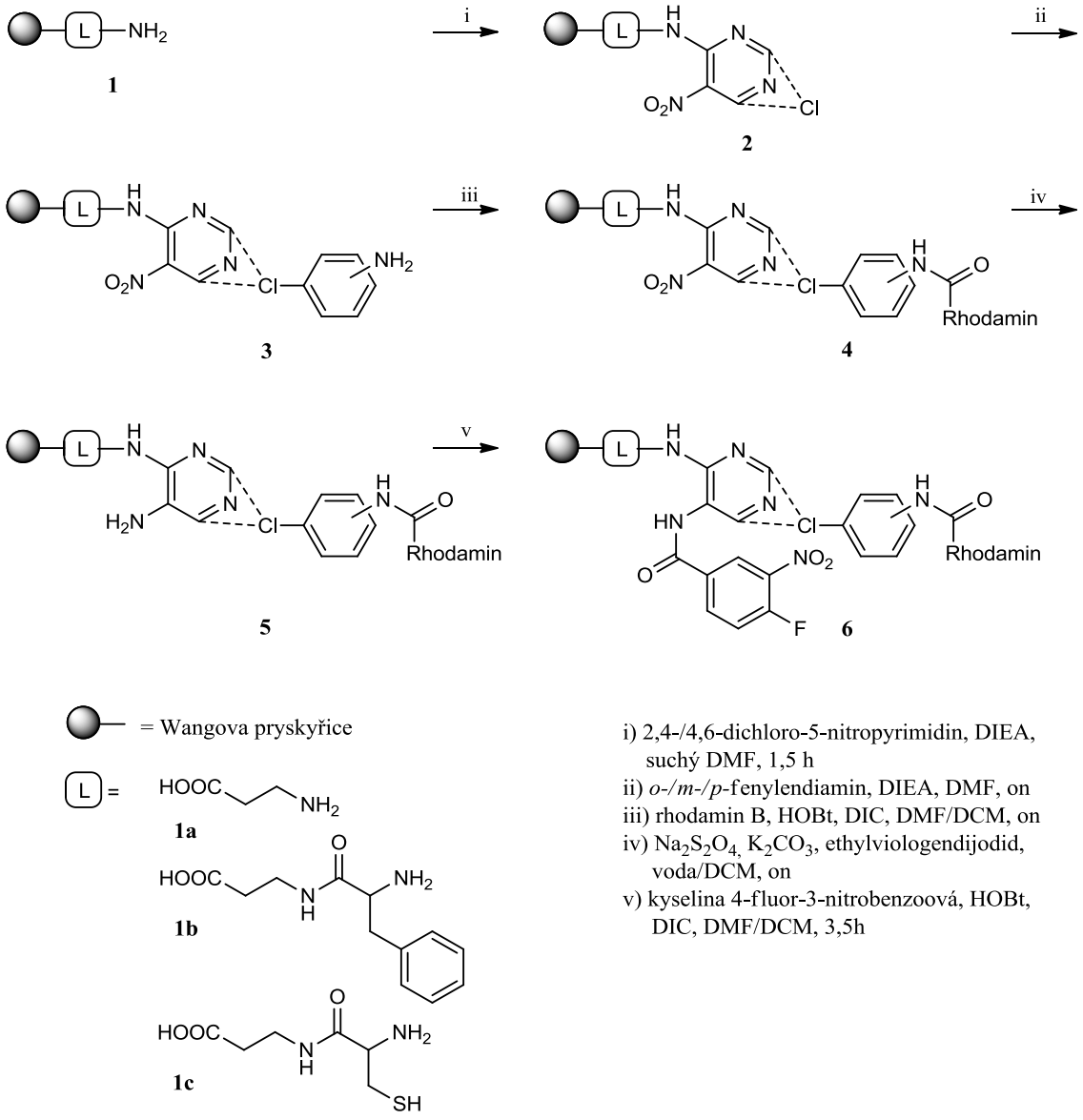


Schéma 1: Obecné schéma syntézy.

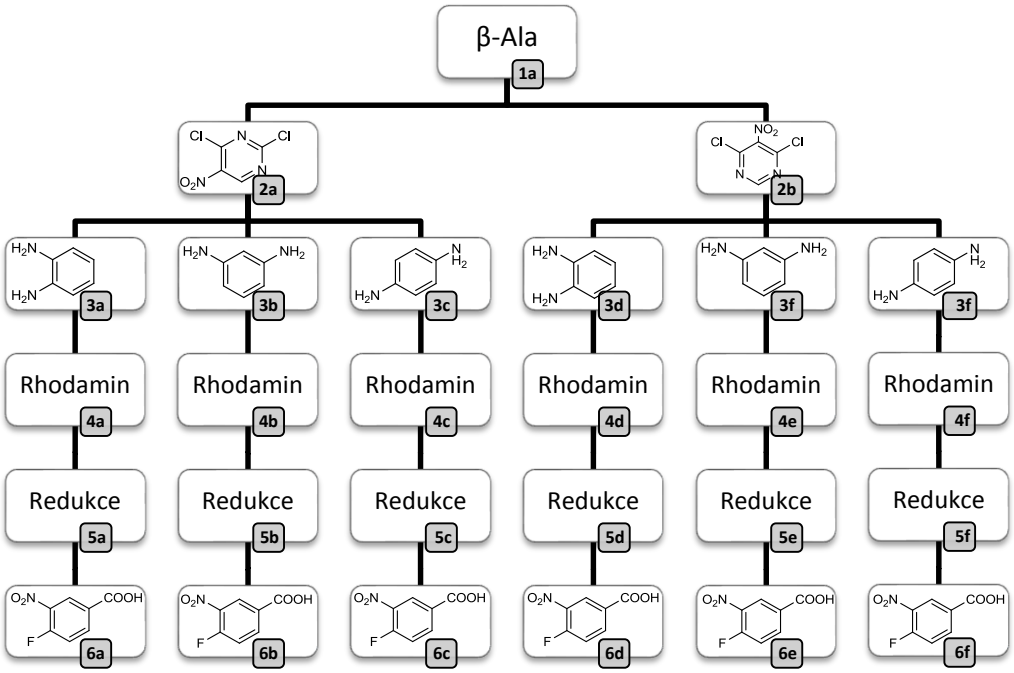


Schéma 2: Znázornění číslování látek odvozených od linkeru s *β*-alaninem.

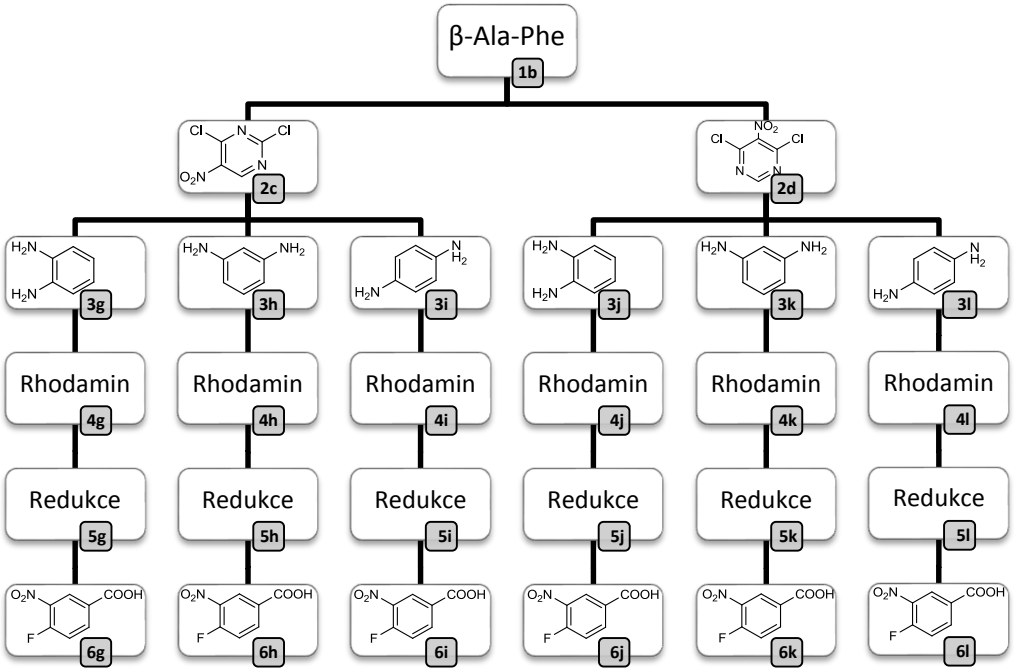


Schéma 3: Znázornění číslování látek odvozených od linkeru s *β*-alaninem a fenylalaninem.

III. PŘÍPRAVA CÍLOVÝCH LÁTEK SYSTÉMU PYRIMIDIN-RHODAMIN

Všechny cílové látky byly připraveny metodou syntézy na pevné fázi. Tento způsob syntézy spočívá v postupném přidávání jednotlivých fragmentů, které se v přesném pořadí naváží na výchozí látku navázanou na polymerní kuličku. Na rozdíl od klasické roztokové syntézy zde odpadá nutnost izolace jednotlivých meziproduktů, které jsou jednoduchým promytím pryskyřice zbaveny nadbytku reagentů. Touto technikou lze připravit velký počet látek v relativně krátkém čase, což má velký význam zejména u kombinatoriálního způsobu přípravy chemických knihoven.

Tato metoda syntézy byla vyvinuta především pro přípravu peptidů nebo oligonukleotidů s přesným pořadím aminokyselin či bází. Za zavedení syntézy na pevné fázi dostal v roce 1984 Robert Bruce Merrifield Nobelovu cenu za chemii.[55] Syntéza na pevné fázi byla popsaná již v mnoha pracích, níže jsou pouze shrnuty základní kroky.

Po navázání prvního stavebního bloku (např. aminokyseliny **8**) je důležité produkt navázaný na pryskyřici dobře promýt, odchránit další funkční skupinu **9** a nasát novou reakční směs. Pro odštěpení produktu z pryskyřice je zapotřebí 30 minutové reakce 50 % roztoku kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu s následným odfoukáním dusíkem. Důležité je chránit všechny ostatní reaktivní skupiny, a proto je využíváno mnoha různých chránících skupin s variabilními způsoby deprotekce (Trt, Fmoc, Boc, BzO, AcO, Me_3SiO…). Princip syntézy na pryskyřici je znázorněn na *schématu č. 4*, kde je použita Wangova pryskyřice **7**.

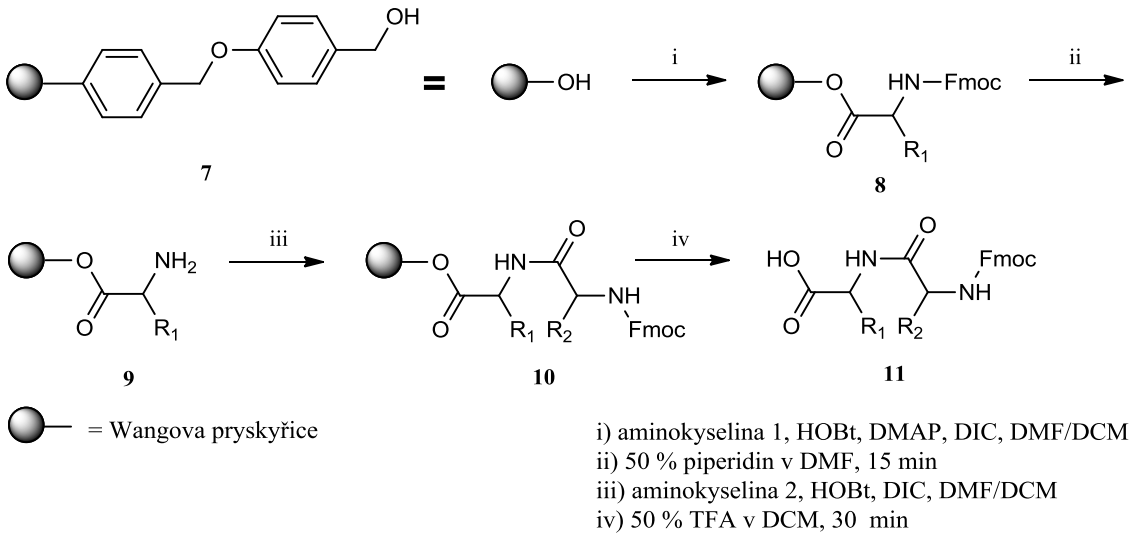


Schéma 4: Princip syntézy na pevné fázi s využitím Wangovy pryskyřice.

Prvním krokem syntézy linkeru je navázání *β*-alaninu na Wangovu pryskyřici *(Schéma 5)*. K navážené Wangově pryskyřici byl přidán 0,3 M roztok reakční směsi obsahující Fmoc-*β*-Ala-OH, HOBt, DMAP a DIC ve směsi dimethylformamidu a dichlormethanu (1:1). Dimethylaminopyridin katalyzuje tvorbu esterové vazby, přes kterou je Fmoc-*β*-Alanin vázán k pryskřici. Reakce běží 1,5 h za vzniku produktu **1a** s loadingem přibližně 0,4 mmol/g. Ten byl vypočítán z LC-MS analýzy za použití standardního roztoku Fmoc-*β*-Ala-OH.

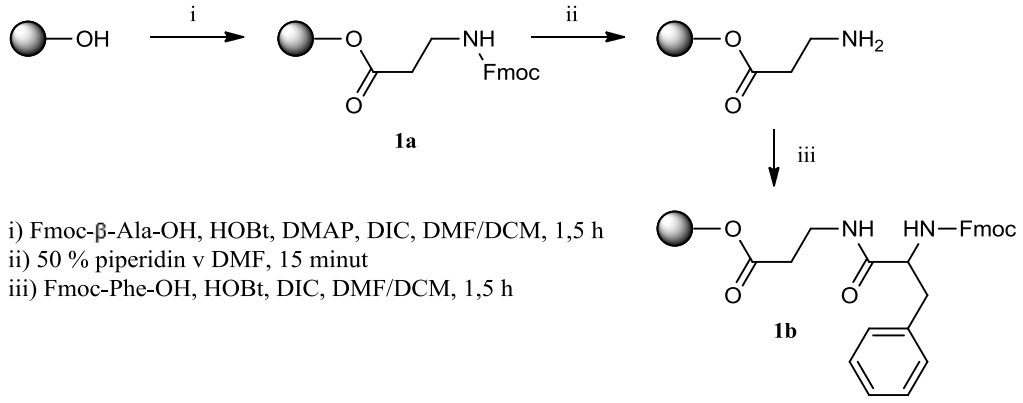
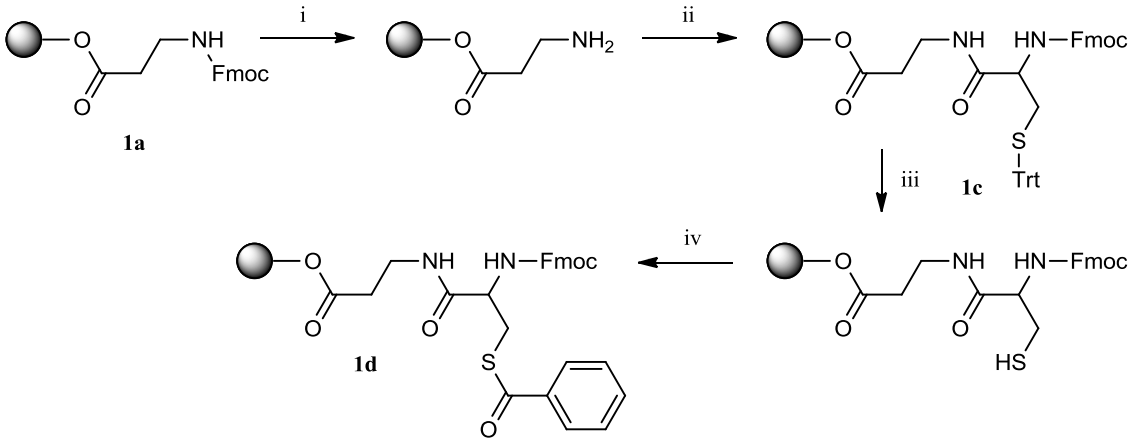


Schéma 5: Příprava Fmoc-*β*-alaninu.

U poloviny látek byl linker prodloužen o fenylalanin *(Schéma 5)*. Pro vznik amidické vazby je zapotřebí defmokovat aminoskupinu Fmoc-*β*-alaninu **1a** 15-ti minutovou reakcí 50 % roztoku piperidinu v DMF. Po dostatečném promytí DMF a DCM byla

za podobných podmínek jako v předchozím kroku provedena acylace HOBt aktivovaným esterem (v tomto případě již nebyla nutná přítomnost DMAP) za vzniku dipeptidu **1b**.

Na konec bylo vyzkoušeno začlenit do linkeru cystein, který by mohl tvořit disulfidickou vazbu s thiolovými skupinami v mitochondriálních proteinech. Po defmokaci aminoskupiny *β*-alaninu **1a** byla použita reakční směs obsahující Fmoc-cystein(Trt), HOBt, DIC, DMAP a DMF/DCM *(Schéma 6)*. Podle LC-MS analýzy poskytla reakce po 1,5 hodině směs látek, jejichž molekulární hmotnosti byly ze získaných hmotnostních spekter špatně čitelné.



i) 50 % piperidin v DMF, 15 minut
ii) Fmoc-Cys(Trt)-OH, HOBt, DIC, DMF/DCM, 1,5 h
iii) TFA, TIS, DCM, 10 minut
iv) kyselina benzoová, HOBt, DMAP, DIC, DMF/DCM, on

Schéma 6: Příprava linkeru *β*-alanin-cystein.

Kromě 4-dimethylaminopyridinu byly vyzkoušeny reakce bez báze i s DIEA, ale nedošlo téměř k žádné změně. Také u následujících reakcí vznikala nepřehledná spektra, takže nešlo pokračovat.

Jelikož tritylová skupina patří do skupiny kysele labilních protektivních skupin, lze předpokládat, že během štěpení látky z pryskyřice v kyselém štěpícím koktejlu dochází současně ke štěpení tritylové skupiny z cysteinu. Za účelem eliminace vedlejších produktů vznikajících při nechtěném odchraňování thiolové skupiny a pro snadnější detekci produktu reakce s cysteinem **1c** byla tritylová skupina nejprve odchráněna reakcí s TFA a triisopropylsilanem (TIS) v DCM a následně benzoylována *(Schéma 6)*. Bohužel

ani tato reakce neběžela podle představ a ani jedna ze vzniklých látek neodpovídala podle LC-MS požadovanému produktu **1d.**

Metoda deprotekce byla vyzkoušena s různými reakčními časy (5, 10 a 15 minut). Mezi těmito reakcemi ale nebyl zjištěn větší rozdíl, proto bylo od přípravy linkeru s cysteinem upuštěno.

Pro přípravu centrální části molekuly byl použit 5-nitropyrimidin substituovaný dvěma chlóry v poloze 2,4 nebo 4,6. Tento stavební blok byl zvolen z důvodu rozložení a variabilitě substituentů, které mohou být využity k dalšímu větvení. Jak je vidět na *schématu č. 7.,* aminoskupina linkeru **1** musela být opět odchráněna. Po obvyklém promytí DMF a DCM je nutné pryskyřice promýt i suchým dimethylformamidem, který byl použit i pro samotnou reakci.

Reakce s 2,4- nebo 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem probíhala v suchém DMF v přítomnosti báze v podobě DIEA za laboratorní teploty. Během 1,5 hodiny byla výchozí látka zcela zreagovaná.

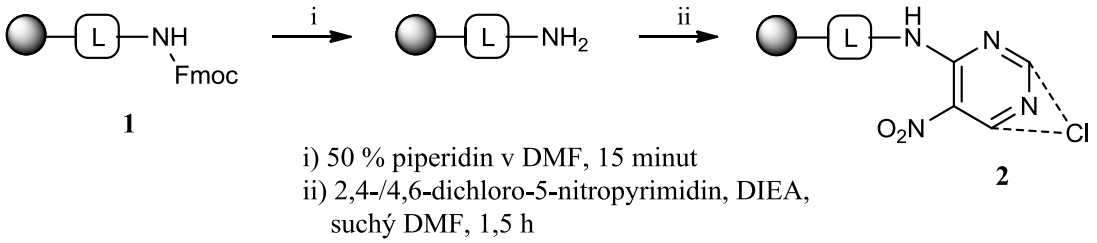
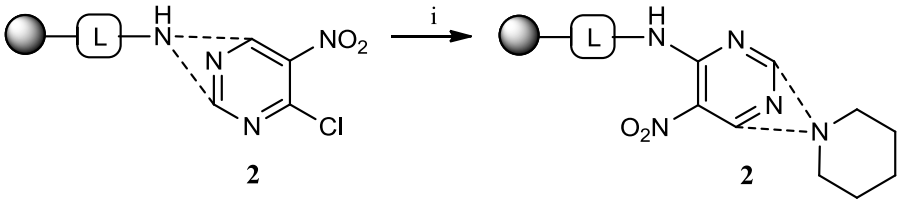


Schéma 7: Příprava systému linker-pyrimidin.

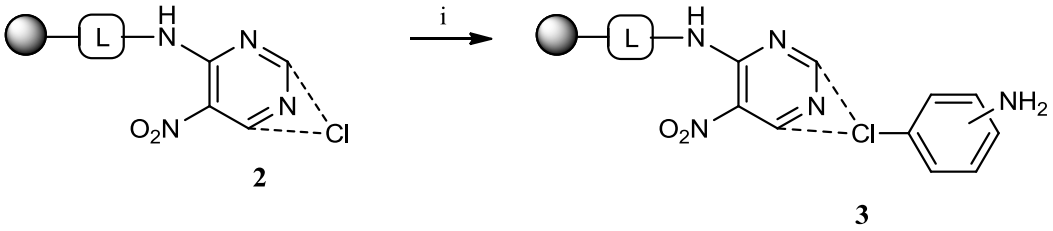
Vysoká reaktivita atomu chlóru znesnadňovala analýzu vzniklých derivátů **2.** Pro jednoznačné určení jejich čistoty bylo analytické množství pryskyřice **2** podrobeno reakci s piperidinem v DMF (*Schéma č. 8*) a vzniklé stabilnější deriváty byly analyzovány pomocí LC-MS.



i) piperidin, DMF, 1 h

Schéma 8: Reakce s piperidinem.

Na *schématu č. 9* je znázorněn syntetický krok substituce chlóru pyrimidinu **2** v prostředí báze a přes noc.



i) *o-/m-/p*-fenylendiamin, DIEA, DMF, on

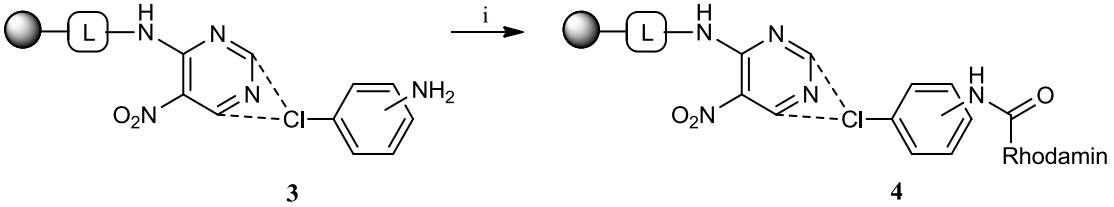
Schéma 9: Příprava centrální části molekuly.

U všech tří izomerů fenylendiaminu byly vyzkoušeny čtyři různé báze: DBU (1,8-diazabicykloundec-7-en), 2,6-lutidin (2,6-dimethylpyridin), proton sponge (N,N,N',N'-tetramethylnaphthalen-1,8-diamin) a DIEA *(Tabulka 1).* Při použití DBU nedocházelo téměř vůbec ke vzniku *o*- a *m*- derivátů a *p*- pouze v malém množství (podle LC/MS analýzy). Pro další syntézy byl vybrán diisopropylethylamin především kvůli jednodušší manipulaci a vyšší čistotě produktů.

Tabulka 1: Shrnutí použitých bazí v reakci s fenylendiaminem.

Báze	pK a[56]	Produkty	LC-MS čistota [%]		
			o-	*m-*	*p-*
2,6-lutidin	6,6	*o-, m-, p-*	**53**	**60**	**66**
DIEA	10,75	*o-, m-, p-*	**78**	**65**	**69**
Proton sponge	12,1	*o-, m-, p-*	**80**	**72**	**60**
DBU	13,5	pouze *p-*	**-**	**-**	**29**

Nedávno vyvinutá metoda[57] zavádí barvivo do molekuly reakcí 0,3 M roztoku Rhodaminu B, HOBt, DIC a DMAP ve směsi DMF/DCM *(Schéma 10)*.



3 **4**

i) rhodamin B, HOBt, DIC, DMF/DCM, on

Schéma 10: Příprava systému pyrimidin-Rhodamin B.

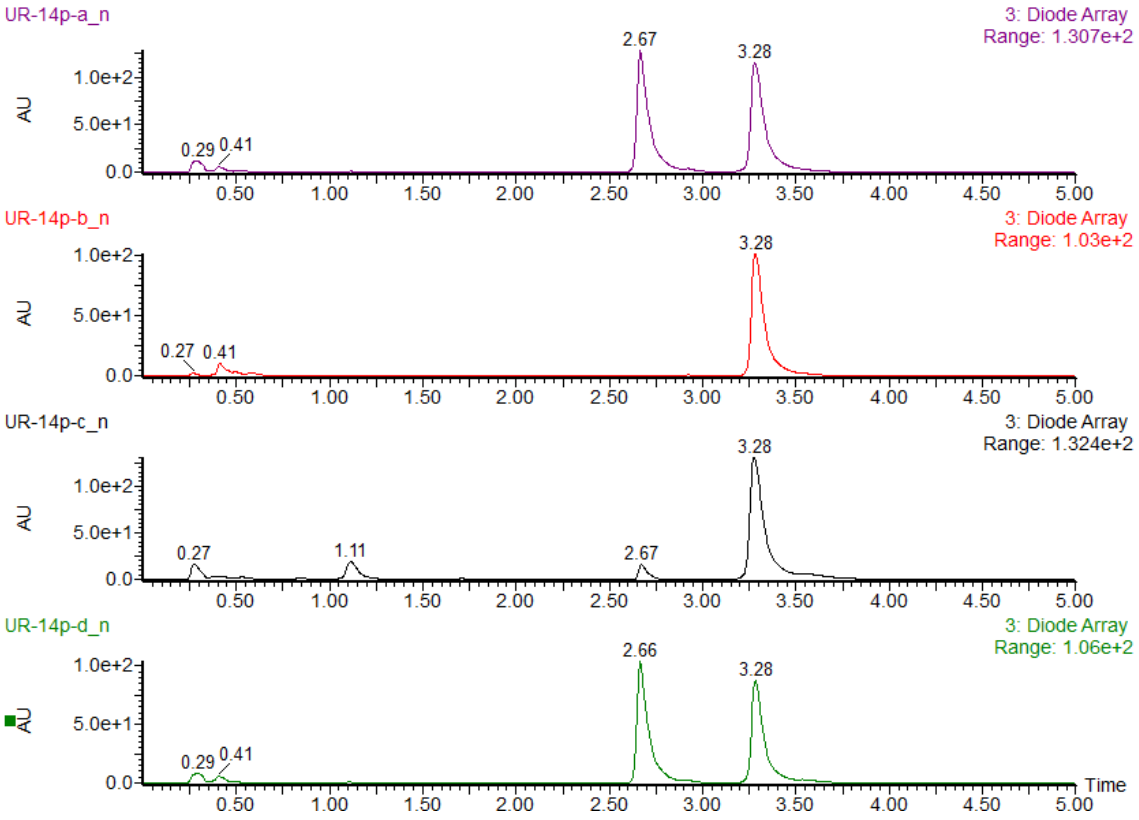
Za těchto podmínek docházelo k tvorbě vedlejšího produktu s molekulovou hmotností MW=445, která byla s produktem v poměru přibližně 1:1. Pro eliminici tvorby nečistoty byly vyzkoušeny různé reakční podmínky, které jsou shrnuty v *tabulce č. 2*. Reagenty byly smíchány přesně v uvedeném pořadí a poté nasáty do stříkačky k fenylendiaminovému meziproduktu **3**.

Tabulka 2: Shrnutí reakčních podmínek acylace Rhodaminem B.

Reakce	Rhodamin B [mmol]	DMF [ml]	DMAP [mmol]	DIC [mmol]	Aktivace [minut]	HOBt [mmol]	DCM [ml]	Poměr*
a	0,3	0,5	0,16	0,3	15	0,3	0,5	0,8:1
b	0,3	0,5	-	0,3	15	0,3	0,5	24:1
c	0,3	0,5	-	0,3	-	0,3	0,5	6,2:1
d	0,3	0,5	0,16	0,3	-	0,3	0,5	0,7:1

*… Poměr produktu **4** a vedlejšího produktu.

Bylo zjištěno, že pro kvantitativní průběh reakce není nutná přítomnost DMAP, která naopak podporuje vznik vedlejšího produktu. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo v případě, kdy byl Rhodamin B ponechán 15 minut reagovat s DIC a poté byl přidán HOBt pro tvorbu aktivovaného esteru (*Tabulka 2., reakce **b***). Předpokládali jsme, že vedlejší produkt může vznikat v důsledku neúplné konverze Wangovy pryskyřice v prvním kroku. Nezreagované volné –OH skupiny pryskyřice by se pak acylovaly v přítomnosti DMAP za vzniku imobilizovaného Rhodaminu B. Na *obrázku č. 2* lze vidět výsledné LC-MS spektra produktů zmíněných 4 reakcí (popisky **a-d** jsou vlevo u každého chromatogramu, produkt má retenční čas 3.28). Pro ověření tohoto předpokladu byla pryskyřice **3** podrobena acylační reakci s Fmoc-fenylalaninem. V přítomnosti volných –OH skupin by mělo dojít ke vzniku esteru Fmoc-phenylalaninu vázaného na pryskyřici. Vznik tohoto produktu však nebyl pozorován. Mechanismus vzniku vedlejšího produktu je zatím neobjasněn.

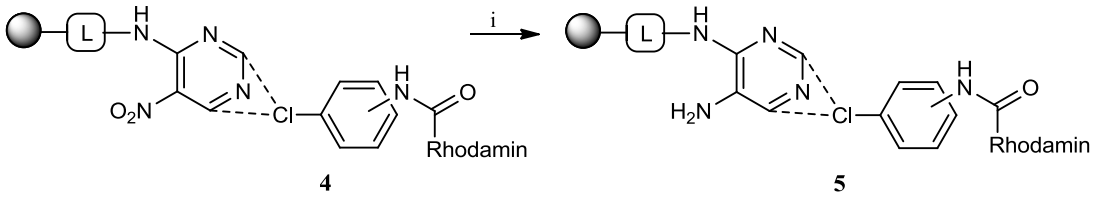


Obrázek 2: LC-MS analýzy produktů zkušebních reakcí.

Pro zavedení fluorovaného fragmentu do molekuly bylo zapotřebí zredukovat nitro skupinu pyrimidinu **4** *(Schéma 11)*. U této reakce bylo vyzkoušeno několik reakčních podmínek, které jsou shrnuty v *tabulce č. 3.*

Tabulka 3: Shrnutí testovaných reakčních podmínek redukce.

	$Na_2S_2O_4$ [mmol]	K_2CO_3 [mmol]	DMF/ voda [ml]	TBAHS [mmol]	Methyl viologen dichlorid [mmol]	Ethyl viologen dijodid [mmol]	$SnCl_2 \cdot 2 H_2O$ [mmol]	DIEA [mmol]	DMF [ml]
a	0,5	0,7	1	0,05	-	-	-	-	-
b	0,5	0,7	1	-	0,05	-	-	-	-
c_1	0,5	0,7	1	-	-	0,05	-	-	-
c_2	0,5	0,7	1	-	-	0,025	-	-	-
c_3	0,5	0,7	1	-	-	0,01	-	-	-
c_4	0,5	0,7	1	-	-	0,005	-	-	-
d	-	-	-	-	-	-	1	1	1



4 **5**

i) $Na_2S_2O_4$, K_2CO_3, ethylviologendijodid, voda/DCM, on

Schéma 11: Redukce nitroskupiny pyrimidinu.

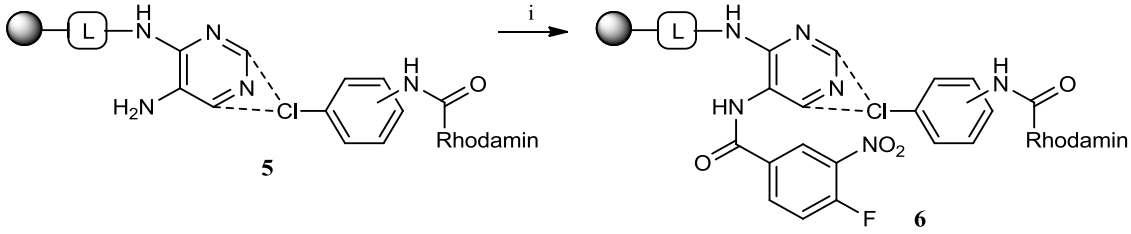
První metodou **a** byla redukce pomocí dithioničitanu sodného, uhličitanu draselného a fázového katalyzátoru v podobě tetrabutylamoniumhydrogensulfátu (TBAHS). Reakce byla provedena ve směsi DCM a vody (1:1) s reakční dobou 24 hodin a bylo nutné zajistit dostatečné mísení. Po skončení reakce a dostatečném promytí DCM/vodou, DMF, MeOH a nakonec DCM byla na chromatogramu detekována nečistota s molekulovou hmotností o 80 jednotek vyšší než očekávaný produkt dosahující až 15 % (podle LC-MS). Vznik analogického vedlejšího produktu byl pozorován již v předešlých pracích, podle kterých dochází k formaci sulfoamidoderivátu.[57]

U reakce **b** byl jako fázový katalyzátor použit methylviologen dichlorid, se kterým k tvorbě nečistoty nedocházelo.

Poté byl kvůli dostupnosti nahrazen ethylviologen dijodidem (reakce **c**), který má ale mnohem horší rozpustnost ve vodě i DCM. U tohoto katalyzátoru byly testovány i nižší koncentrace než udává literatura.[58] V případě reakce $\mathbf{c_1}$ a $\mathbf{c_2}$ došlo k úplnému zreagování a vzniku žádaného produktu **5**. Koncetrace 0,01 mmol/ml a nižší nebyla dostatečná a po 24 hodinové reakci bylo na LC-MS spektru detekováno 10 % výchozí látky (reakce $\mathbf{c_3}$ a $\mathbf{c_4}$).

Poslední testovanou metodou byla redukce pomocí chloridu cínatého **d**. V tomto případě byl použit 1 M roztok $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$ a DIEA v DMF, který byl předem probublán dusíkem. Při použití této metody došlo podle LC-MS analýzy k plnému zredukování výchozí látky. Od dalšího používání bylo ale kvůli vzniku problematicky odstranitelných anorganických solí upuštěno.

Posledním krokem bylo návázání kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové, prostřednictvím které by se mohly cílové molekuly kovalentně vázat do mitochondrií. K reakci byl použit 0,3 M roztok kyseliny, HOBt a DIC v DMF/DCM *(Schéma 12.)*. Reakční doba nutná pro stoprocentní konverzi byla 3,5 hodiny.



i) kyselina 4-fluor-3-nitrobenzoová, HOBt, DIC, DMF/DCM, 3,5h

Schéma 12: Příprava cílové látky s kyselinou 4-fluor-3-nitrobenzoovou.

Všechny deriváty byly přečištěny na HPLC Breeze s mobilní fází acetonitril/acetátový pufr metodou 50-60 na 80 % MeCN. Acetonitril byl poté odpařen na vakuové odparce při 40°C a zbylý pufr následně vysušen na lyofilizátoru. V *tabulce č. 4* je uveden přehled nasyntetizovaných látek.

Tabulka 4: Přehled připravených látek.

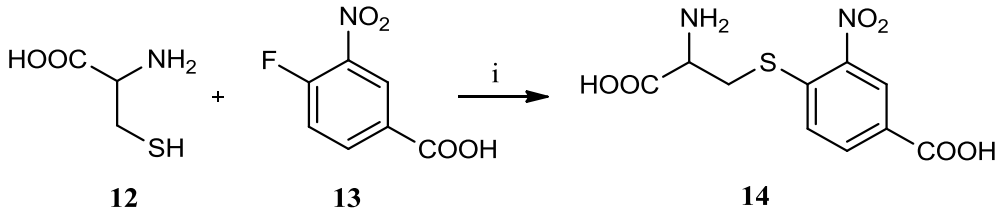
Kód látky	Linker	Pyrimidin	Fenylendiamin	LC-MS čistota surových produktů [%]	Výtěžek po HPLC purifikaci [%]
6a	β-Ala	2,4	*o*-	43	8
6b	β-Ala	2,4	*m*-	46	10
6c	β-Ala	2,4	*p*-	50	18
6d	β-Ala	4,6	*o*-	65	25
6e	β-Ala	4,6	*m*-	64	24
6f	β-Ala	4,6	*p*-	70	33
6g	β-Ala-Phe	2,4	*o*-	78	41
6h	β-Ala-Phe	2,4	*m*-	82	13
6i	β-Ala-Phe	2,4	*p*-	86	22
6j	β-Ala-Phe	4,6	*o*-	71	20
6k	β-Ala-Phe	4,6	*m*-	73	42
6l	β-Ala-Phe	4,6	*p*-	51	4

IV. REAKTIVITA CÍLOVÝCH LÁTEK

Před samotným testováním látek na penetraci do buněk a jejich schopnost udržet se v buňce i po chemické fixaci byla na vybraných derivátech testována jejich reaktivita. Výsledky této studie jsou shrnuty v následujících dvou podkapitolách.

i. Reaktivita s thiolovými skupinami

Jak již bylo řečeno, mitochondrie jsou bohaté na cystein a volné thiolové skupiny, které mohou substituovat atom fluoru cílových derivátů. Ty jsou také cílem připravených fluorovaných produktů. Nejprve byla vyzkoušena reaktivita nechráněného cysteinu **12** a kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové **13** *(Schéma 13).*



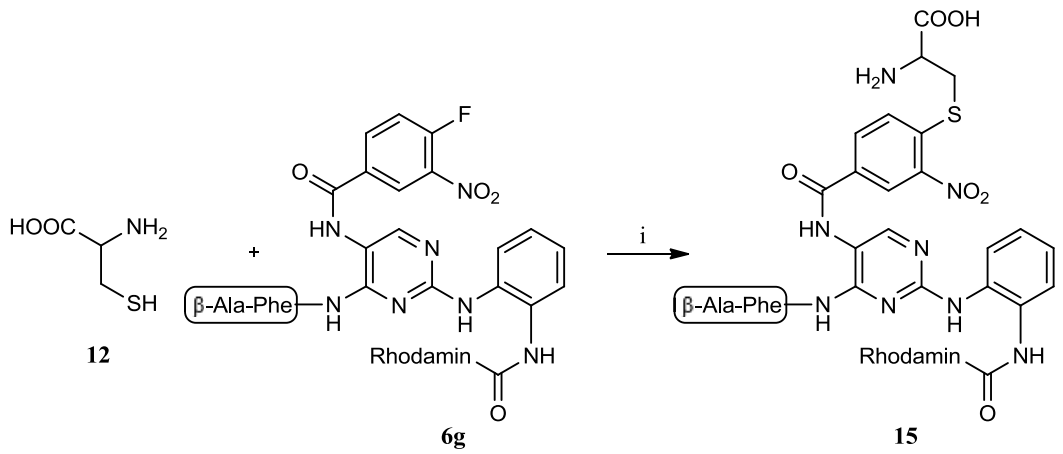
12 **13** **14**

i) K_2CO_3, voda, 15 minut - 1h
voda, DMSO, 15 minut - 1h
2 ekv. K_2CO_3, voda, 15 minut - 1h

Schéma 13: Reakce cysteinu s kyselinou 4-fluor-3-nitrobenzoovou.

Kvůli špatné rozpustnosti cysteinu ve vodě byl cystein převeden na sůl kyseliny přidáním ekvivalentního množství K_2CO_3. Po přidání kyseliny **13** byl roztok třepán za pokojové teploty a po 15 a 60 minutách zanalyzován. Na LC-MS byl kromě neznámých píků pozorován táhlý pík poblíž nástřikového, který ukazoval hmotu produktu **14**. Podobně byla otestována i reakce bez použití báze. V tomto případě byl cystein rozpuštěn v DMSO a roztok doředěn vodou v poměru 1:1. Reakce poskytla podobný výsledek jako v předchozím případě.

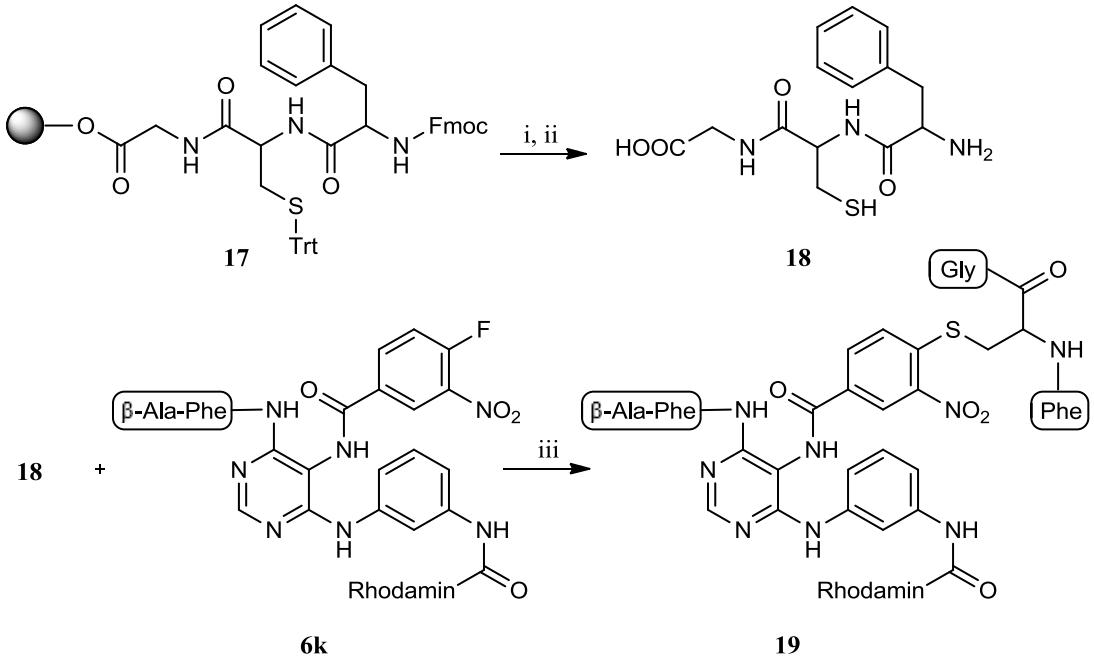
Obdobné reakční podmínky byly použity i u reakce nechráněného cysteinu **12** a cílové látky **6g** *(Schéma 14).* Podobně jako u reakce se samotnou kyselinou 4-fluor-3-nitrobenzoovou i v tomto případě byl po 15 minutách detekován produkt **15.** Po prodloužení reakční doby na 60 minut docházelo k tvorbě nečistot. Stejné reakci byl podroben i derivát **6k.** Výsledky byly obdobné.



i) K_2CO_3, voda, 15 minut - 1h

Schéma 14: Reakce cysteinu s cílovou látkou.

Na závěr bylo vyzkoušeno, jak cílové látky reagují s tripeptidem obsahujícím cystein. Požadovaný tripeptid se sekvencí aminokyselin Gly-Cys(Trt)-Fmoc-Phe-OH **17** byl připraven na pevné fázi s využitím HOBt metody *(Schéma č. 15)*. Chráněný peptid nebyl moc dobře rozpustný ve vodě, a proto bylo nutné Fmoc skupinu z molekuly odstranit.



i) 50 % piperidin, DMF, 15 minut
ii) TFA, TIS, DCM, 1 h
iii) DMSO, voda, 15 - 100 minut
voda, 15 - 120 minut
voda, 50°C, 15 - 120 minut
voda, 80°C, 15 - 120 minut

Schéma 15: Deprotekce tripeptidu a reakce s cílovou látkou.

Připravený tripeptid **17** byl na pryskyřici nejprve defmokován reakcí s piperidinem v DMF. Po dostatečném promytí byla pryskyřice třepána 1 hodinu v roztoku kyseliny trifluoroctové a TIS v DCM, kdy byla z thiolové skupiny odstraněna tritylová skupina a současně byla sloučenina odštěpena z pryskyřice. Po odpaření štěpícího koktejlu pod proudem dusíku byl k odparku přidán diethylether. Suspenze byla sonifikována v ultrazvuku, přefiltrována za vakua za zisku produktu **18** o dostatečné čistotě.

Reaktivita cílových sloučenin s thiolovou skupinou získaného peptidu byla testována na derivátu **6k**. Pro špatnou rozpustnost ve vodě byl tento derivát nejprve rozpuštěn v DMSO a následně byl roztok doředěn vodou 1:1. Reakce byla ukončena po dvou hodinách od přidání tripetidu a podle LC-MS byly detekovány pouze výchozí látky.

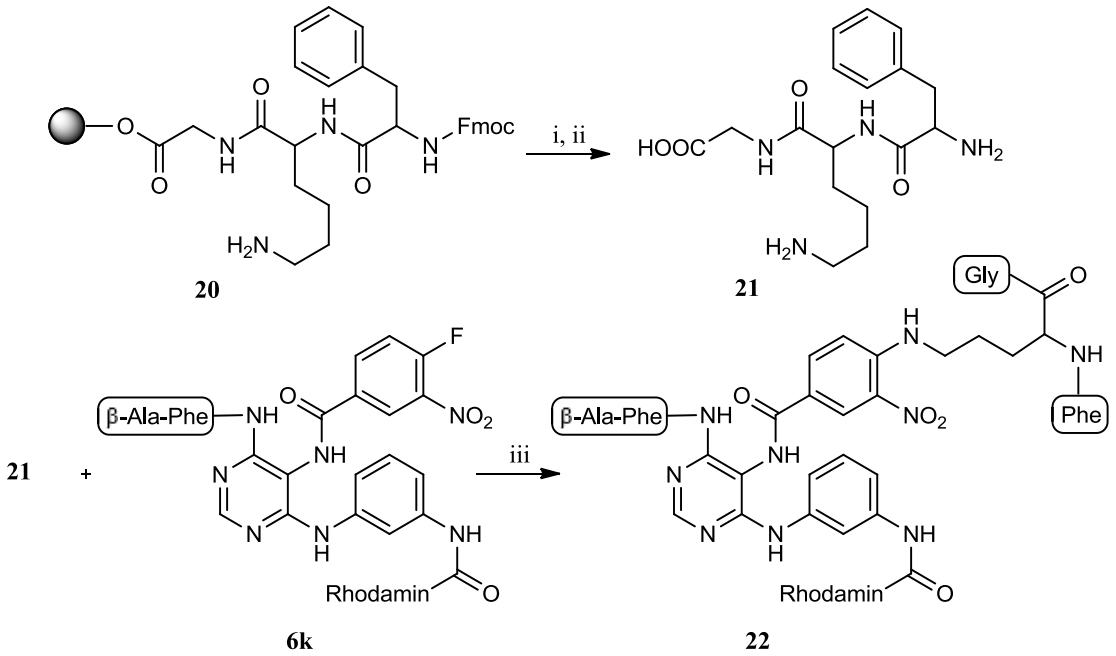
Pokusili jsme se reaktivitu látky **6k** podpořit zvýšením teploty a reakci provedli při 50°C a 80°C. Ani v tomto případě produkt **19** nevznikal.

Lepších výsledků bylo dosaženo za přítomnosti báze. Stejně jako v případě reakce se samotným cysteinem byl použit 1 ekvivalent K_2CO_3. Po 15 minutách byl na LC-MS spektru zaznamenán pozitivní průběh reakce.

ii. Reaktivita s amino skupinami

Obdobným způsobem jako u thiolových skupin, byla studována reaktivita cílové látky **6k** s tripeptidem **20** (s NH_2 skupinou v postranním řetězci) obsahujícím Gly-Lys-Fmoc-Phe-OH. Stejně jako v předchozím případě byl tripeptid **21** připraven na pryskyřici, odchráněn a po sonifikaci v etheru odsát za vakua *(Schéma č. 16)*.

Reakce byly provedeny za stejných podmínek jako u tripeptidu **19**, tzn. ve směsi DMSO:voda (1:1) při třech různých teplotách (RT, 50°C a 80°C). Podobně jako v předchozí podkapitole byla reakce sledována až 2 hodiny, ale ani v jednom případě nedocházelo ke vzniku očekávaného produktu **22.**



i) 50 % piperidin, DMF, 15 minut
ii) TFA, DCM, 1h
iii) DMSO, voda, 15 - 100 minut
voda, 15 - 120 minut
voda, 50°C, 15 - 120 minut
voda, 80°C, 15 - 120 minut

Schéma 16: Deprotekce tripeptidu a reakce s cílovou látkou.

V. FLUORESCENČNÍ VLASTNOSTI LÁTEK

V následujících třech podkapitolách jsou popsány všechny naměřené fluorescenční vlastnosti cílových látek.

i. Základní fluorescenční vlastnosti

Základní fluorescenční vlastnosti všech cílových látek jsou shrnuty v *tabulce č. 5.*

Tabulka 5: Shrnutí excitačních a emisních vlnových délek u všech cílových látek.

Látka	λ_{exc} [nm]	$\lambda_{em,1}$ [nm]	$\lambda_{em,2}$ [nm]	ϕ [%]
6a	556	415	579	80
6b	554	-	579	18
6c	560	-	588	26
6d	558	-	581	27
6e	557	-	580	19
6f	550	-	569	4
6g	559	-	581	19
6h	560	-	581	14
6i	564	482	588	70
6j	554	-	576	40
6k	555	-	580	5
6l	547	422	570	46

λ_{exc} [nm] … excitační vlnová délka

$\lambda_{em,1}$ [nm] … fluorescenční emisní maximum při nižší vlnové délce

$\lambda_{em,2}$ [nm] … fluorescenční emisní maximum při vyšší vlnové délce

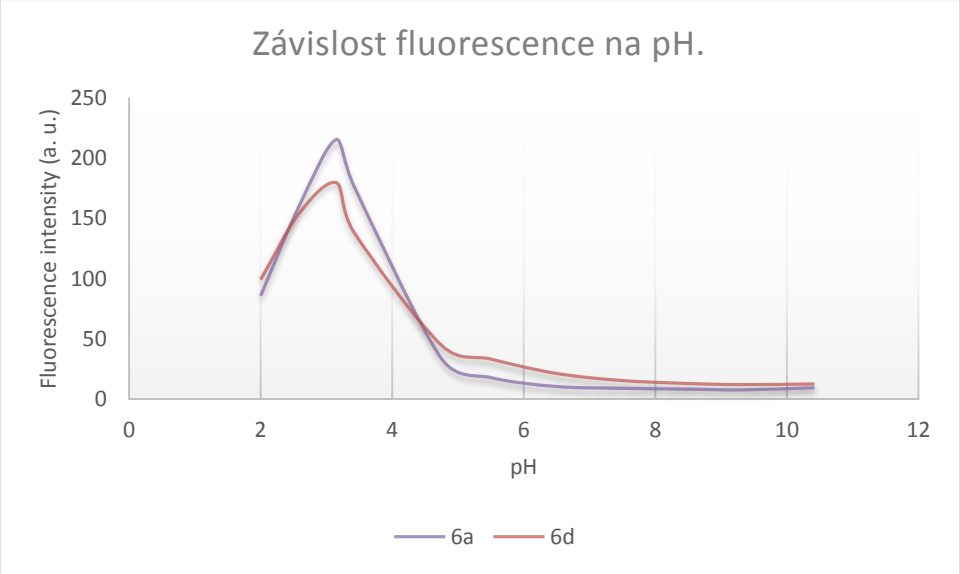
ϕ [%] … kvantový výtěžek

Excitační i emisní spektra byla naměřena na fluorescenčním spektrofotometru. Kvantový výtěžek byl stanoven porovnáním emise zkoumané látky s fluorescencí chinin sulfátu jako standardem.

ii. Závislost fluorescence na pH

U dvou látek **6a, d** byla změřena také jejich závislost na změně pH. Z *grafu č. 1* je patrné, že u obou studovaných látek se fluorescence mění v závislosti na pH prostředí a v neutrální a bazické oblasti přestávají fluoreskovat.

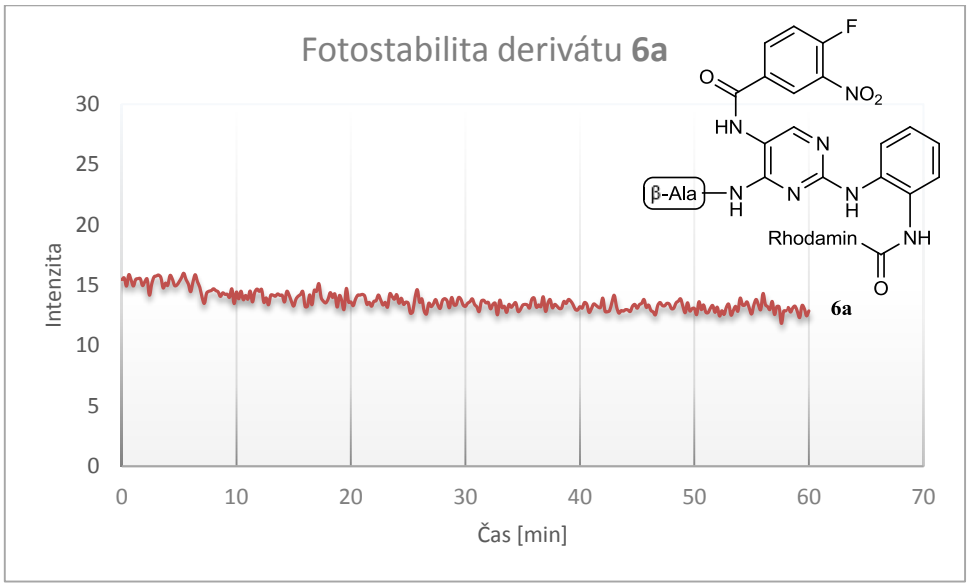
Graf 1: Znázornění závislosti fluorescence na pH.



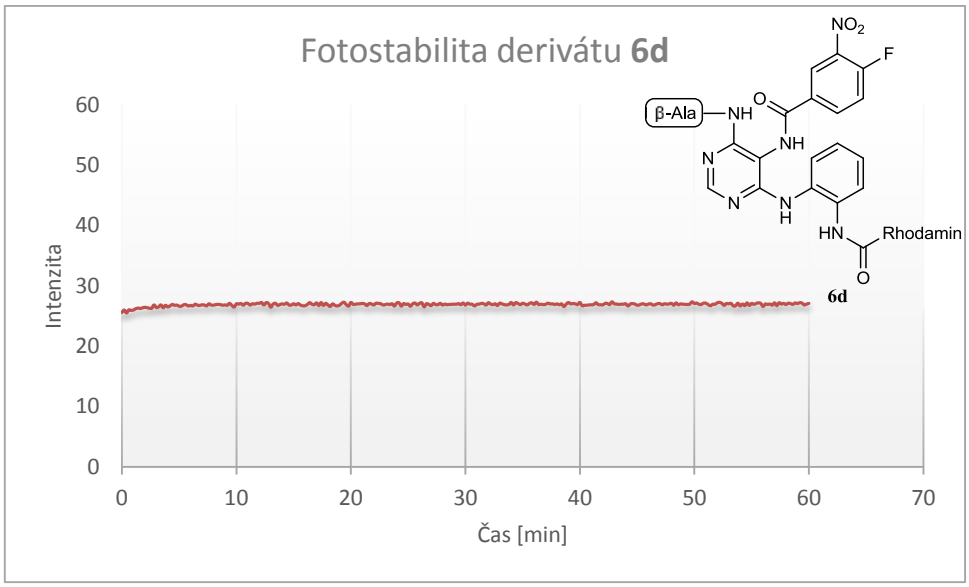
iii. Fotostabilita

U tří vybraných zástupců **6a, 6d** a **6i** byla studována fotostabilita ve fosfátovém pufru (pH = 7,4). Bylo zjištěno, že po dobu jedné hodiny jsou značky stabilní, což je opět zřetelné na doložených grafech *(Grafy č. 2-4).*

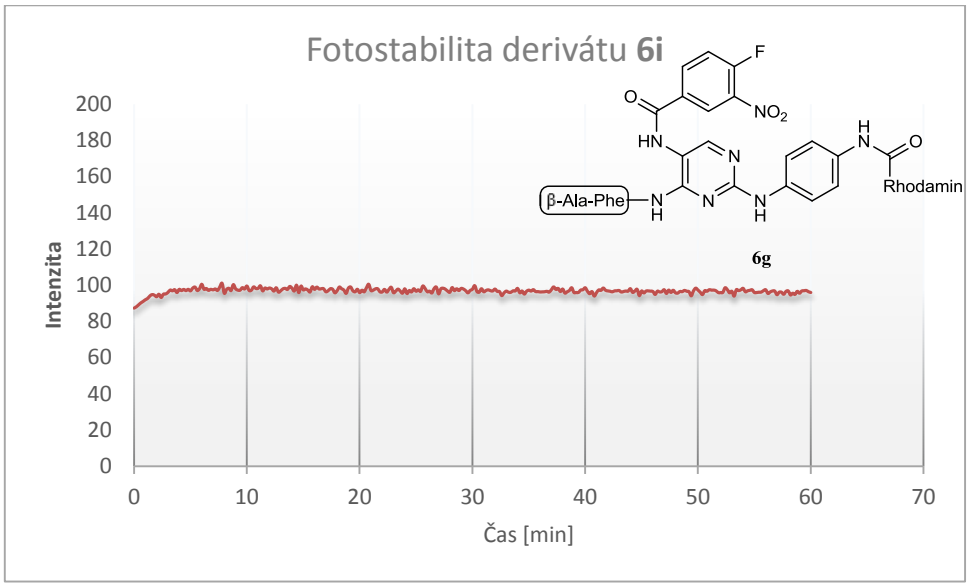
Graf 2: Znázornění fotostability derivátu 6a.



Graf 3: Znázornění fotostability derivátu 6d.

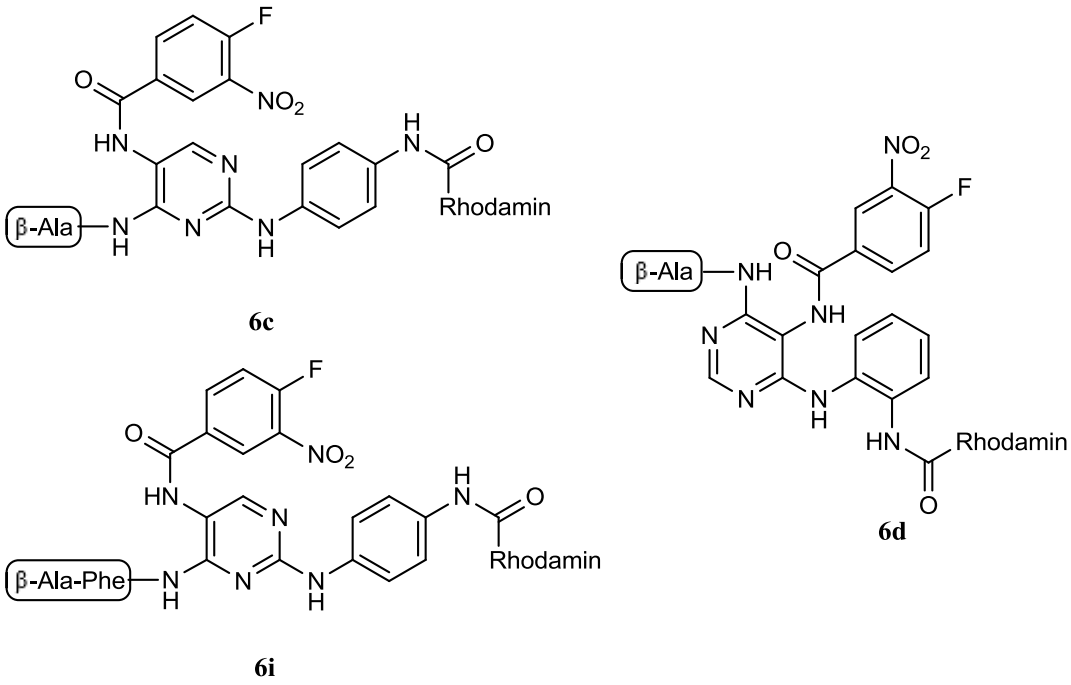


Graf 4: Znázornění fotostability derivátu 6i.



VI. STABILITA

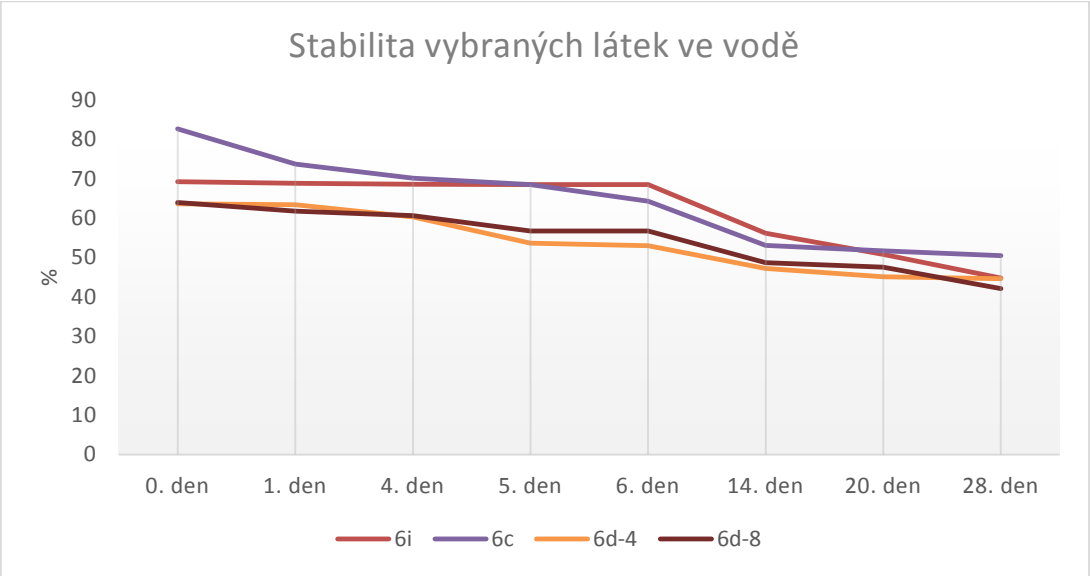
Z důvodu nestability pozorované u podobných látek z předešlé práce[59] byla u vybraných derivátů *(Obrázek 3)* zkoumána stabilita ve vodě.



Obrázek 3: Struktury látek zkoumaných na stabilitu ve vodě.

Látky byly rozpuštěny ve vodném roztoku o pH přibližně 4 (**6c**) respektive 8 (**6i**). Látka **6d** byla rozpuštěna ve směsi DMSO a H2O a pH upraveno na 4 a 8. Roztoky byly skladovány za pokojové teploty a analyzovány pomocí LC-MS v průběhu 4 týdnů. V *grafu č. 5* lze sledovat stabilitu látek **6c**, **6i**, **6d-4** a **6d-8** ve dnech, přičemž osa y je dána v procentech. Z grafu lze vyčíst, že látky se za měsíc rozložily maximálně z 30 %.

Graf 5: Znázornění stability některých látek ve vodě.

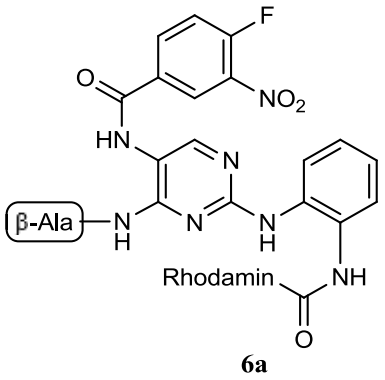


VII. MĚŘENÍ PENETRACE CÍLOVÝCH LÁTEK DO BUNĚK

Jak již bylo řečeno, součástí této práce je studie průchodu syntetizovaných látek přes buněčnou membránu. Pro měření byla použita buněčná linie U2OS. Tyto buňky byly poprvé vyizolovány z lidského osteosarkomu roku 1964 z nádorové kostní tkáně patnáctileté dívky.[60]

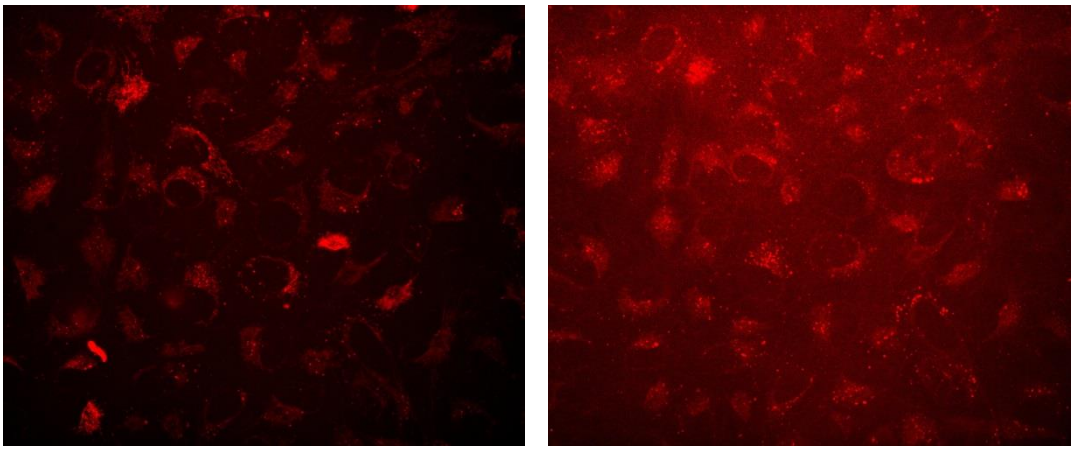
Látky byly aplikovány nejdříve na živé buňky, které byly pozorovány pod mikroskopem Yokogawa CV7000 při excitační vlnové délce 561 nm *(Obrázek 5)*. Z testovaných sloučenin penetrovala přes buněčnou membránu pouze jedna látka **6a**. Následně byla provedena chemická fixace „nabarvených" buněk za použití formaldehydu a za stejných podmínek pořízeny snímky buněčného vzorku *(Obrázek 5)*. Z obrázků je patrné, že po fixaci dochází k vymývání značky z buněk.

Současně byla studována i schopnost finálních látek penetrovat do předem fixovaných buněk a bylo zjištěno, že derivát **6a** penetruje i přes membránu předem fixovaných buněk *(Obrázek 6)*.

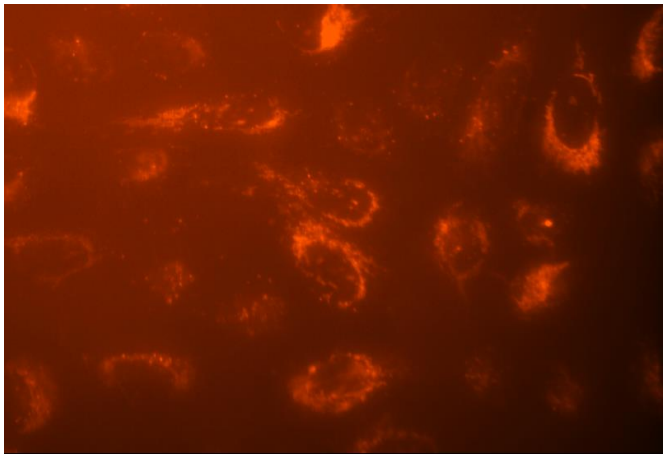


6a

Obrázek 4: Struktura úspěšné látky.



Obrázek 5: Nabarvené živé buňky linie U2OS (vlevo); buňky linie U2OS po fixaci (vpravo)



Obrázek 6: Nabarvené fixované buňky linie U2OS.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

i. Metody

Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na hmotnostním spektrometru s jednoduchým kvadrupólem (Waters) s kolonou X-Select C18 za použití mobilní fáze složené z (A) 0,01 M octanu amonného ve vodě a (B) acetonitrilu. Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO – *d6* na Jeol ECX-500 (500 MHz) Hodnoty chemického posunu (δ) jsou udány v ppm jednotkách, interakční konstanty (*J*) v Hz. Preparativní HPLC byla prováděna s využitím přístroje Waters 1500 series a preparativní kolony YMC-Pack Pro C1820x100mm s-5μm, 12 nm. Mobilní fáze byla složena z 0,01 M octanu amonného a acetonitrilu. TLC chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 F254 značky Merck. Emisní spektra byla zaznamenána na fluorescenčním spektrofotometru Cary Eclipse (FL1009M015, Varian). UV-VIS spektra byla měřena na spektrofotometru Cary 300 UV-VIS (UV1111M031, Agilent Technologies). Kvantový výtěžek byl stanoven porovnáním emise zkoumané látky s fluorescencí chinin sulfátu jako standardem.

Pro štěpení vzorků z pevné fáze a jeho následnou LC-MS analýzu bylo z každého produktu odebráno analytické množství (5 - 10 mg) promyté pryskyřice. Po dobu 30 minut byla pryskyřice míchána ve směsi 50% TFA/DCM (1 ml). Po odpaření rozpouštědla pod proudem dusíku byl odparek rozpuštěn v methanolu pro HPLC (1 ml) a po filtraci přes mikrofiltr změřen na LC-MS.

ii. Přípravy

Příprava linkeru obsahujícího Fmoc-*β*-alanin **1a**

Wangova pryskyřice (1 g) byla 3x promyta DMF a 3x DCM. Do stříkačky byl přidán 0,3 M roztok Fmoc-*β*-Ala-OH (1,288 g), HOBt (660,5 mg), DMAP (139,5 mg) a DIC (697 μl) ve 14 ml DMF/DCM (1:1). Reakce byla třepána za laboratorní teploty po dobu 1,5 hodiny. Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x).

MS m/z pro $C_{18}H_{17}NO_4$: 311,12, nalezeno 310 [M-1]. Čistota 97 %.

Příprava linkeru obsahujícího Fmoc-fenylalanin-*β*-alanin 1b

Výchozí látka **1a** (cca 1 g) byla defmokována reakcí s 50 % piperidinem v DMF (10 ml) po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Po odstranění reakční směsi byla pryskyřice 3x promyta DMF a 5x DCM. Do stříkačky byl přidán 0,3 M roztok Fmoc-Phe-OH (1,16 g; 3,0 mmol), HOBt (0,46 g; 3,0 mmol) a DIC (0,47 ml; 3,0 mmol) v 10 ml DMF/DCM (1:1). Reakce byla třepána za laboratorní teploty po dobu 1,5 hodiny. Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x).

MS m/z pro $C_{27}H_{26}N_2O_5$: 458,18, nalezeno 457 [M-1]. Čistota 91 %.

Příprava látky se systémem linker-pyrimidin 2

Výchozí látka **1** (cca 1 g) byla defmokována reakcí s 50 % piperidinem v DMF (10 ml) po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Po odstranění reakční směsi byla pryskyřice 3x promyta DMF, 5x DCM a 3x suchým DMF. Do stříkačky byl přidán 0,5 M roztok 2,4 nebo 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinu (0,97 g; 5,0 mmol), DIEA (0,83 ml; 5,0 mmol) v suchém DMF (10 ml). Reakce byla třepána za laboratorní teploty po dobu 1,5 hodiny. Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x). Níže je přehled připravených meziproduktů **2**.

Kód látky	Linker	Pyrimidin	LC-MS čistota [%]	MS
2a	β-Ala	2,4	72	MS m/z pro $C_7H_7ClN_4O_4$: 246,02 nalezeno 245 $[M-1]^-$
2b	β-Ala	4,6	67	MS m/z pro $C_7H_7ClN_4O_4$: 393,08 nalezeno 392 $[M-1]^-$
2c	β-Ala-Phe	2,4	63	MS m/z pro $C_7H_7ClN_4O_4$: 393,08 nalezeno 392 $[M-1]^-$
2d	β-Ala-Phe	4,6	59	MS m/z pro $C_7H_7ClN_4O_4$: 393,08 nalezeno 392 $[M-1]^-$

Příprava látky se systémem linker-pyrimidin-fenylendiamin **3**

Do stříkačky k výchozí látce **2** byl přidán 0,5 M roztok *o*-, *m*- nebo *p*-fenylendiaminu (0,54 g; 5,0 mmol), DIEA (0,83 ml; 5,0 mmol) v DMF (10 ml). Reakce byla třepána za laboratorní teploty přes noc (cca 16 h). Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x). Níže je přehled připravených meziproduktů **3**.

Kód látky	Výchozí látka	Fenylendiamin	LC-MS čistota [%]	MS
3a	**2a**	*o*-	88	MS m/z pro $C_{13}H_{14}N_6O_4$: 318,11 nalezeno 317 $[M-1]^-$
3b	**2a**	*m*-	85	MS m/z pro $C_{13}H_{14}N_6O_4$: 318,11 nalezeno 317 $[M-1]^-$
3c	**2a**	*p*-	90	MS m/z pro $C_{13}H_{14}N_6O_4$: 318,11 nalezeno 317 $[M-1]^-$
3d	**2b**	*o*-	59	MS m/z pro $C_{13}H_{14}N_6O_4$: 318,11 nalezeno 317 $[M-1]^-$
3e	**2b**	*m*-	65	MS m/z pro $C_{13}H_{14}N_6O_4$: 318,11 nalezeno 317 $[M-1]^-$
3f	**2b**	*p*-	79	MS m/z pro $C_{13}H_{14}N_6O_4$: 318,11 nalezeno 317 $[M-1]^-$
3g	**2c**	*o*-	87	MS m/z pro $C_{22}H_{23}N_7O_5$: 465,18 nalezeno 464 $[M-1]^-$
3h	**2c**	*m*-	86	MS m/z pro $C_{22}H_{23}N_7O_5$: 465,18 nalezeno 464 $[M-1]^-$
3i	**2c**	*p*-	92	MS m/z pro $C_{22}H_{23}N_7O_5$: 465,18 nalezeno 464 $[M-1]^-$
3j	**2d**	*o*-	78	MS m/z pro $C_{22}H_{23}N_7O_5$: 465,18 nalezeno 464 $[M-1]^-$
3k	**2d**	*m*-	57	MS m/z pro $C_{22}H_{23}N_7O_5$: 465,18 nalezeno 464 $[M-1]^-$
3l	**2d**	*p*-	91	MS m/z pro $C_{22}H_{23}N_7O_5$: 465,18 nalezeno 464 $[M-1]^-$

Příprava látky se systémem linker-pyrimidin-rhodamin B **4**

V kádince byl rozpuštěn Rhodamin B (1,53 g; 3,0 mmol) a DIC (0,5 ml; 3,0 mmol) v 5 ml DMF. Po 15 minutách promíchávání byl přidán HOBt (0,49 g; 3,0 mmol) a DCM (5 ml) a reakční směs byla nasána do stříkačky k výchozí látce **3**. Reakce byla třepána za laboratorní teploty přes noc (cca 16 h). Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (8x) a DCM (8x). Níže je přehled připravených meziproduktů **4**.

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS
4a	66	MS m/z pro $C_{41}H_{43}N_8O_6$: 743,33 nalezeno 742 $[M-1]^-$
4b	74	MS m/z pro $C_{41}H_{43}N_8O_6$: 743,33 nalezeno 742 $[M-1]^-$
4c	79	MS m/z pro $C_{41}H_{43}N_8O_6$: 743,33 nalezeno 742 $[M-1]^-$
4d	80	MS m/z pro $C_{41}H_{43}N_8O_6$: 743,33 nalezeno 742 $[M-1]^-$
4e	82	MS m/z pro $C_{41}H_{43}N_8O_6$: 743,33 nalezeno 742 $[M-1]^-$
4f	79	MS m/z pro $C_{41}H_{43}N_8O_6$: 743,33 nalezeno 742 $[M-1]^-$
4g	83	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 889 $[M-1]^-$
4h	86	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 889 $[M-1]^-$
4i	80	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 889 $[M-1]^-$
4j	78	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 889 $[M-1]^-$
4k	85	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 889 $[M-1]^-$
4l	72	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 889 $[M-1]^-$

Příprava redukované látky se systémem linker-pyrimidin-rhodamin B **5**

Metoda s $Na_2S_2O_4$, K_2CO_3 a fázovým katalyzátorem:

Do stříkačky k výchozí látce **4** (cca 0,5 g) byl přidán 0,5 M roztok $Na_2S_2O_4$ (0,87 g; 5,0 mmol), K_2CO_3 (0,97 g; 7,0 mmol) a fázového katalyzátoru ve směsi DCM/voda (10 ml). Jako katalyzátor byl použit TBAHS (0,17 g; 0,4 mmol) nebo methylviologendichlorid (64,3 mg) a nebo ethylviologendijodid (0,12 g; 0,3 mmol). Reakce byla třepána za laboratorní teploty přes noc (cca 16 h). Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DCM/voda (3x), DMF (3x), MeOH (3x) a DCM (3x).

Metoda s $SnCl_2$:

Analytické množství výchozí látky **4** bylo promyto DMF, který byl probublán dusíkem. Poté byl k pryskyřici přidán 1M roztok $SnCl_2$ (0,23 g; 1 mmol) a DIEA (0,17 ml; 1 mmol) v připraveném DMF (1ml). Reakce byla třepána za laboratorní teploty přes noc (cca 16 h). Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x). Níže je přehled připravených meziproduktů **5**.

Kód látky	**LC-MS čistota [%]**	**MS**
5a	66	MS m/z pro $C_{41}H_{45}N_8O_4$: 713,36 nalezeno 712 $[M-1]^-$
5b	74	MS m/z pro $C_{41}H_{45}N_8O_4$: 713,36 nalezeno 712 $[M-1]^-$
5c	79	MS m/z pro $C_{41}H_{45}N_8O_4$: 713,36 nalezeno 712 $[M-1]^-$
5d	80	MS m/z pro $C_{41}H_{45}N_8O_4$: 713,36 nalezeno 712 $[M-1]^-$
5e	82	MS m/z pro $C_{41}H_{45}N_8O_4$: 713,36 nalezeno 712 $[M-1]^-$
5f	79	MS m/z pro $C_{41}H_{45}N_8O_4$: 713,36 nalezeno 712 $[M-1]^-$
5g	83	MS m/z pro $C_{50}H_{54}N_9O_5$: 860,42 nalezeno 859 $[M-1]^-$
5h	86	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 859 $[M-1]^-$

5i	80	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 859 $[M-1]^-$
5j	78	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 859 $[M-1]^-$
5k	85	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 859 $[M-1]^-$
5l	72	MS m/z pro $C_{50}H_{52}N_9O_7$: 890,40 nalezeno 859 $[M-1]^-$

Příprava cílových látek se systémem linker-pyrimidin-rhodamin B 6

Do stříkačky byl přidán 0,3 M roztok kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové (0,28 g; 3,0 mmol), HOBt (0,23 g; 3,0 mmol) a DIC (0,23 ml; 3,0 mmol) v 5 ml DMF/DCM (1:1). Reakce byla třepána za laboratorní teploty po dobu 3 hodin. Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x). Všechny látky byly čištěny na HPLC s mobilní fází složenou z MeCN a acetátového pufru.

6a N-(9-(2-((2-((4-((2-karboxyethyl)amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido) pyrimidin-2-yl)amino)fenyl)karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6a	43	MS m/z pro $C_{48}H_{47}FN_9O_7$: 880,36, nalezeno 879 $[M-1]^-$	7,9

NMR spektra derivátu **6a** nebyla interpretovatelná (tento jev byl pozorován i u některých derivátů z předešlé práce [57]), proto nejsou NMR data doložena.

6b N-(9-(2-((3-((4-((2-karboxyethyl)amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido) pyrimidin-2-yl)amino)fenyl)karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6b	46	MS m/z pro $C_{48}H_{47}FN_9O_7$: 880,36, nalezeno 879 $[M-1]^-$	10,3

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.00 (t, *J*=6.9 Hz, 12 H) 2.51-2.53 (m, 2 H) 3.24 (q, *J*=6.9 Hz, 8 H) 3.53 (q, *J*=6.7 Hz, 2 H) 6.17 - 6.25 (m, 3 H) 6.33 (dd, *J*=9.2, 2.3 Hz, 2 H) 6.51 (m, 2 H) 6.88 - 6.95 (m, 2 H) 6.99 (d, *J*=7.5 Hz, 1 H) 7.38 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 7.45 - 7.54 (m, 2 H) 7.63 (s, 1 H) 7.68 (s, 1 H) 7.73 - 7.75 (m, 1 H) 7.83 (d, *J*=6.9 Hz, 1 H) 8.34 - 8.36 (m,1 H) 8.73 (dd, *J*=7.2, 2.0 Hz, 1 H) 8.97 (s, 1 H) 9.76 (s, 1 H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.9, 34.3, 36.8, 44.1, 66.9, 97.8, 106.3, 108.6, 109.3, 116.8, 117.6, 118.5, 119.1 (d, *J*=22 Hz), 123.3, 124.2, 126.4, 128.4, 128.8, 129.0, 130.2, 131.8, 133.7, 136.3 (d, *J*=10 Hz), 137.5, 141.9, 148.8, 152.8, 154.3, 154.6 (d, *J*=289Hz), 158.3, 158.9, 163.9, 167.3, 173.6.

6c **N-(9-(2-((4-((4-((2-karboxyethyl)amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido) pyrimidin-2-yl)amino)fenyl)karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium**

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6c	50	MS m/z pro $C_{48}H_{47}FN_9O_7$: 880,36, nalezeno 879 $[M-1]^-$	17,5

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.03 (t, *J*=6.87 Hz, 12 H) 2.52 – 2.54 (m, 2 H) 3.25 (q, *J*=1.00 Hz, 8 H) 3.51 - 3.56 (m, 2 H), 6.19 (m, 1H), 6.22 (d, *J*=2.75 Hz, 1 H) 6.36 (dd, *J*=8.93, 2.52 Hz, 2 H) 6.49 - 6.55 (m, 4 H) 7.00 - 7.06 (m, 2 H) 7.46 - 7.54 (m, 4 H) 7.70 - 7.74 (m, 2 H) 7.82 (dd, *J*=5.95, 1.83 Hz, 1 H) 8.33 – 8.35 (m, 1 H) 8.71 (dd, *J*=7.33, 2.29 Hz, 1 H) 9.07 (s, 1 H) 9.78 (s, 1 H), 12.18 (b.s., 1H).

6d **N-(9-(2-((2-((6-((2-karboxyethyl)amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido) pyrimidin-4-yl)amino)fenyl)karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium**

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6d	65	MS m/z pro $C_{48}H_{47}FN_9O_7$: 880,36, nalezeno 879 $[M-1]^-$	25,4

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 0.95-0.95 (m, 6H), 1.09 - 1.12 (m, 6 H), 2.42 - 2.47 (m, 2 H), 2.53 – 2.57 (m, 4H), 3.14 – 3.17 (m, 4 H) 3.43 – 3.52 (m, 2 H) 5.55 (d, *J*=8.01 Hz, 1 H) 5.98 (s, 1 H) 6.10 (dd, *J*=8.00, 1.10 Hz, 1 H) 6.29 (s, 1 H) 6.46 – 6.52 (m, 3 H) 6.73 – 6.79 (m, 2 H) 6.97 (d, *J*=7.56 Hz, 1 H) 7.03 - 7.14 (m, 3 H) 7.34 (t, *J*=7.44 Hz, 1 H) 7.46 - 7.53 (m, 2 H) 7.77 (s, 1 H) 7.88 – 7.93 (m, 1 H) 8.36 - 8.43 (m, 1 H) 8.71 (dd, *J*=7.21, 1.95 Hz, 1 H) 9.80 (s, 1 H) 12.10 (br. s., 1 H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.90, 34.77, 36.98, 44.25, 68.61, 96.98, 106.3, 107.72, 108.9, 119.07, 123.1, 123.64, 124.37, 126.3, 126.92 (d, *J*=10 Hz), 127.84, 128.46, 128.91, 130.04, 131.48, 131.49, 133.71, 136.8, 137.1 (d, *J*=7 Hz), 152.49, 154.27, 155.72, 155.81, 156.8 (d, *J*=266 HZ) 158.99, 163.46, 167.35, 173.62.

6e **N-(9-(2-((3-((6-((2-karboxyethyl)amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido) pyrimidin-4-yl)amino)fenyl)karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium**

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6e	64	MS m/z pro $C_{48}H_{47}FN_9O_7$: 880,36, nalezeno 879 $[M-1]^-$	23,9

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.01 (t, *J*=6.87 Hz, 12 H) 2.45 – 2.48 (m 2 H) 3.25 – 3.31 (m, 8 H) 3.50 (q, *J*=6.00 Hz, 2 H) 6.22 (d, *J*=1.83 Hz, 2 H) 6.32 (dd, *J*=8.70, 2.29 Hz, 2 H) 6.37 (d, *J*=8.24 Hz, 1 H) 6.52 – 6.54 (m, 2 H) 6.59 (t, *J*=5.50 Hz, 1 H) 6.91 - 7.00 (m, 2 H) 7.16 (d, *J*=8.24 Hz, 1 H) 7.44 - 7.54 (m, 3 H) 7.75 – 7.80 (m, 1 H) 7.81 (d, *J*=6.41 Hz, 1 H) 7.92 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.39 – 8.43 (m, 1 H) 8.75 (dd, *J*=7.10, 2.06 Hz, 1 H) 9.55 (s, 1 H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.9, 34.8, 37.0, 44.1, 66.9, 97.2, 97.8, 106.1, 108.6, 118.6 (d, *J*=21 Hz), 119.3, 119.6, 123.3, 124.2, 126.8, 128.9, 129.4, 129.9, 132.3,

133.8, 136.8 (d, *J*=8 Hz), 136.9, 137.33, 140.9, 148.8, 152.7, 154.5, 155.8, 156.0, 156.6 (d, *J*=266 Hz), 159.1, 163.6, 167.4, 173.7, 207.0.

6f **N-(9-(2-((4-((6-((2-karboxyethyl)amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido) pyrimidin-4-yl)amino)fenyl)karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium**

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6f	70	MS m/z pro $C_{48}H_{47}FN_9O_7$: 880,36, nalezeno 879 $[M-1]^-$	32,7

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.02 (t, *J*=6.87 Hz, 12 H) 2.41 (t, *J*=7.10 Hz, 2 H) 3.24 (q, *J*=6.90 Hz, 8 H) 3.46 (q, *J*=6.00 Hz, 2 H) 6.20 (d, *J*=2.29 Hz, 2 H) 6.35 (dd, *J*=9.20, 2.30 Hz, 2 H) 6.52 – 6.55 (m, 4 H) 6.64 (t, *J*=5.72 Hz, 1 H) 7.05 (dd, *J*=6.18, 1.60 Hz, 1 H) 7.27 (d, *J*=8.70 Hz, 2 H) 7.48 - 7.57 (m, 2 H) 7.73 – 7.78 (m, 1 H) 7.82 (dd, *J*=6.40, 2.30 Hz, 1 H) 8.01 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 8.38 – 8.42 (m, 1 H) 8.74 (dd, *J*=7.33, 2.29 Hz, 1 H) 9.59 (br. s., 1 H).

6g **N-(9-(2-((2-((4-((1-((2-karboxyethyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl) amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)pyrimidin-2-yl)amino)fenyl) karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium**

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6g	78	MS m/z pro $C_{57}H_{56}FN_{10}O_8$: 1027,43, nalezeno 1026 $[M-1]^-$	40,7

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 0.77 - 1.14 (m, 12H), 2.64 - 2.76 (m, 2H), 2.78 - 2.89 (m, 2H), 2.96 - 3.22 (m, 10H), 4.58 – 4.65 (m, 1H), 6.10 – 6.23 (m, 4H), 6.52 (d, *J*=8.3 Hz) 6.70 (t, *J*=7.8 Hz), 6.88 (s, 1H), 7.06 - 7.20 (m, 8H), 7.58 - 7.65 (m, 2H), 7.74 – 7.85 (m, 3H), 7.96 – 7.99 (m, 2H), 8.36 – 8.39 (m, 1H), 8.72 (d, *J*=7.45 Hz, 1H), 9.96 (s, 1H), 12.16 (br. s., 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.9, 34.1, 35.3, 38.2, 41.0, 44.2, 68.3, 97.7, 109.9, 119.4 (d, *J*=22 Hz), 122.4, 123.5, 124.8, 126.4, 126.7, 127.7, 128.4, 128.6, 129.3, 129.66, 130.8, 131.5, 134.1, 136.3, 136.4, 137.1 (d, *J*=7 Hz), 137.8, 138.1,149.1, 153.1, 153.4, 156.9 (d, *J*=267 Hz), 157.4, 163.8, 167.0, 173.2.

6h **N-(9-(2-((3-((4-((1-((2-karboxyethyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl) amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)pyrimidin-2-yl)amino)fenyl) karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium**

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6h	82	MS m/z pro $C_{57}H_{56}FN_{10}O_8$: 1027,43, nalezeno 1026 $[M-1]^-$	15,9

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 0.94 - 1.07 (m, 12 H), 2.27 – 2.30 (m, 2H), 2.94 – 3.29 (m, 12 H), 4.78 - 4.90 (m, 1H), 6.23 (d, *J*=8.47 Hz, 4H), 6.35 (d, *J*=8.70 Hz, 1H), 6.46 (d, *J*=8.70 Hz, 1H), 6.57 (d, *J*=8.93 Hz, 1H), 6.92 - 7.05 (m, 2H), 7.06 – 6.99 (m, 2H), 7.12 – 7.13 (m, 3H), 7.22 – 7.24 (m, 3H), 7.48 - 7.58 (m, 3H), 7.73 - 7.83 (m, 2H), 7.86 - 7.91 (m, 1H), 7.95 - 8.01 (m, 1H), 8.35 - 8.43 (m, 1H), 8.76 (d, *J*=7.10 Hz, 1H), 9.22 (br. s., 1H), 10.01 (br. s., 1H), 12.23 (b.s., 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.9, 34.1, 35.5, 37.8, 44.2, 55.8, 67.2, 97.8, 108.6, 109.5, 119.4 (d, *J*=21 Hz), 123.4, 124.3, 126.5, 126.8, 128.5, 128.8, 129.0, 129.1, 129.7, 130.1, 131.5, 133.9, 136.5, 137.1 (d, *J*=8 Hz), 137.5, 138.4, 148.8, 152.8, 154.3, 156.5 (d, *J*=267 Hz), 164.1, 167.6, 171.5, 173.3.

6i **N-(9-(2-((4-((4-((1-((2-karboxyethyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl) amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)pyrimidin-2-yl)amino)fenyl) karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium**

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6i	86	MS m/z pro $C_{57}H_{56}FN_{10}O_8$: 1027,43, nalezeno 1026 $[M-1]^-$	21,7

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 0.98 - 1.07 (m, 12 H), 2.31 (t, *J*=6.90 Hz, 2H), 2.9 – 2.94 (m, 1 H), 3.12 – 3.15 (m, 1H), m – překryv s vodou, 4.75 (m, 1 H), 6.24 (s, 2H), 6.37 (d, *J*=8.60 Hz, 2H), 6.51 - 6.60 (m, 4 H), 6.84 (d, *J*=8.59 Hz, 1H), 7.02 - 7.16 (m, 6H), 7.32 (d, *J*=9.16 Hz, 2H), 7.48 - 7.56 (m, 2H), 7.79 – 7.83 (m, 2 H), 7.84 (d, *J*=6.30 Hz, 1H), 8.02 (t, *J*=5.44 Hz, 1H), 8.36 - 8.42 (m, 1H), 8.75 (dd, *J*=6.87, 2.29 Hz, 1H), 9.01(s, 1H), 10.00 (br. s., 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.9, 34.1, 35.5, 37.9, 44.2, 55.8, 66.9, 97.7, 106.2, 108.6, 109.3, 118.6, 119.3 (d, *J*=21 Hz), 123.3, 124.4, 126.5, 126.7, 127.6, 128.56, 128.9, 129.2, 129.6, 129.9, 130.8, 131.6, 133.6, 136.5, 137.0 (d, *J*=7 Hz), 138.6, 139.8, 148.9, 152.9, 153.6 (d, *J*=288 Hz), 153.9, 155.9, 158.1, 164.0, 167.1, 171.5, 173.3.

6j **N-(9-(2-((2-((6-((1-((2-karboxyethyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl) amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)pyrimidin-4-yl)amino)fenyl) karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium**

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6j	71	MS m/z pro $C_{57}H_{56}FN_{10}O_8$: 1027,43, nalezeno 1026 $[M-1]^-$	20,0

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.05 (t, *J*=6.9 Hz, 12H), 2.31 (t, *J*=6.87 Hz, 2H), 2.91 – 3.05 (m, 2H), 3.20 – 3.31 (m, 10H), 4.78 – 4.82 (m, 1H), 6.21 (d, *J*=1.83 Hz, 2H), 6.24 (d, *J*=8.24 Hz, 1H), 6.32 (dd, *J*=9.16, 2.29 Hz, 2H), 6.52 – 6.57 (m, 4H), 7.0 - 7.3

(m, 1H), 7.12 – 7.16 (m, 6H), 7. 30 (d, *J*=7.6 Hz, 2H), 7.43 - 7.54 (m, 2H), 7.74 - 7.79 (m, 1H), 7.79 - 7.83 (m, 1H), 7.99 – 8.02 (m, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.37 - 8.42 (m, 1H), 8.79 (dd, *J*=7.10, 2.06 Hz, 1H), 9.70 (s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.91, 31.2, 34.1, 35.4, 38.0, 44.1, 55.3, 66.9, 97.6, 97.8, 106.1, 108.6, 118.9 (d, *J*=21 Hz), 119.4, 119.7, 119.9, 123.3, 124.3, 126.7, 126.8, 128.2, 128.5, 128.9, 129.7, 129.9, 131.9, 133.8, 136.8, 136.9 (d, *J*=8 Hz), 137.4, 138.5, 140.7, 148.8, 152.7, 154.4, 155.4, 155.6, 156.0, 158.0, 163.7, 167.4, 171.9, 173.3.

6k **N-(9-(2-((3-((6-((1-((2-karboxyethyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl) amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)pyrimidin-4-yl)amino)fenyl) karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium**

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6k	73	MS m/z pro $C_{57}H_{56}FN_{10}O_8$: 1027,43, nalezeno 1026 $[M-1]^-$	42,1

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.00 (q, *J*=6.90 Hz, 12H), 2.29 (t, *J*=7.16 Hz, 2H), 2.90 – 2.94 (m, 1H), 3.00 – 3.02 (m, 1H), 3.17 - 3.27 (m, 10H), 4.75 - 4.81 (m, 1H), 6.19 - 6.24 (m, 3H), 6.32 (dd, *J*=8.59, 2.29 H, 2Hz), 6.37 (d, *J*=8.02 Hz, 1H), 6.48 (d, *J*=9.16 Hz, 2H), 6.93 - 6.99 (m, 2H), 7.07 - 7.16 (m, 6H), 7.44 - 7.54 (m, 3H), 7.75 – 7.79 (m, 1H), 7.81 (d, *J*=7.45 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.97 (t, *J*=5.44 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.37 - 8.42 (m, 1H), 8.78 (dd, *J*=7.16, 2.00 Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.9, 34.2, 35.4, 38.1, 44.1, 55.3, 67.0, 97.6, 97.8, 106.2, 108.6, 118.9 (d, *J*=25 Hz), 119.4, 119.7, 119.9, 123.3, 124.2, 126.7, 126.8, 128.2, 128.5, 128.9, 129.7, 130.0, 131.9, 133.8, 136.8, 136.8, 136.9 (d, *J*=8 Hz), 137.4, 138.5, 140.7, 148.8, 152.7, 154.4, 155.7, 156.1, 156.8 (d, *J*=266 Hz), 158.1, 163.7, 167.3, 171.9, 173.3.

6l **N-(9-(2-((4-((6-((1-((2-karboxyethyl)amino)-1-oxo-3-fenylpropan-2-yl) amino)-5-(4-fluoro-3-nitrobenzamido)pyrimidin-4-yl)amino)fenyl)**

karbamoyl)fenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminium

Kód látky	LC-MS čistota [%]	MS	Výtěžek [%]
6l	51	MS m/z pro $C_{57}H_{56}FN_{10}O_8$: 1027,43, nalezeno 1026 $[M-1]^-$	3,6

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 1.01 (t, *J*=6.90 Hz, 12H), 2.29 (t, *J*=6.87 Hz, 2H), 2.94 – 3.07 (m, 2H), 3.21 – 3.31 (m, 10H), 4.73 - 4.80 (m, 1H), 6.18 – 6.20 (m, 2H), 6.29 (d, *J*=8.02 Hz, 1H), 6.35 (dd, *J*=8.59, 2.29 Hz, 2H), 6.47 - 6.55 (m, 4H), 7.03 - 7.09 (m, 1H), 7.10 - 7.13 (m, 6H), 7.26 (d, *J*=9.16 Hz, 2H), 7.49 - 7.55 (m, 2H), 7.76 – 7.79 (m, 1H), 7.82 (d, *J*=6.30 Hz, 1H), 7.95 - 7.98 (m, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.37 – 8.39 (m, 1H), 8.77 (dd, *J*=7.16, 2.00 Hz, 1H), 9.70 (s, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-d_6) δ ppm 12.9, 34.1, 35.4, 38.1, 44.2, 55.3, 67.0, 97.7, 106.1, 108.6, 121.6, 123.3, 124.4, 126.7, 126.8, 127.2, 128.5, 129.2, 129.7, 130.78 - 130.89 (m), 131.2, 131.9, 133.7, 136.8 (d, *J*=8 Hz), 138.4, 148.8, 152.9, 153.7, 155.8 (d, *J*=268 Hz), 156.2, 158.2, 163.7, 167.0, 171.9, 173.3, 232.1.

ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla věnována syntéze derivátů pyrimidinu, které by mohly být využity jako nové fluorescenční značky. K přípravě cílových látek byla využita syntéza na pevné fázi jako rychlý a efektivní způsob přípravy většího počtu látek.

V úvodní teoretické části je shrnuto několik fluorescenčních značek používaných jako pH indikátory. Uvedeny jsou i méně obvyklé způsoby barvení pomocí polystyrenových či fosfolipidových mikročástic, bakteriofágů, kvantových bodů a silikonových nanočástic. Zmíněny jsou také multifunkční sondy, které jsou schopné měřit více parametrů. Další kapitola je věnována stavbě a funkci mitochondrií včetně výčtu používaných barviv.

Praktická část navazuje na předešlou práci, zaměřenou na přípravu derivátů se systémem pyrimidin-Rhodamin B. Záměrem této práce byla příprava sloučenin, které oproti původním molekulám obsahují navíc halogenarylový zbytek nebo -SH skupinu, které by umožnily kovalentní navázání značky v mitochondrii. Z těchto dvou plánovaných modifikací byla úspěšná pouze první zmiňovaná, která poskytla deriváty nesoucí fluorfenylový zbytek. V průběhu práce byly také optimalizovány reakční podmínky nedávno vyvinuté metody.

V rámci této diplomové práce se podařilo připravit 12 různě substituovaných derivátů, u kterých byly testovány jejich základní fluorescenční vlastnosti. U vybraných derivátů byla studována závislost fluorescence na pH a bylo zjištěno, že na rozdíl od sloučenin z předešlé práce, jsou tyto nové látky pH-dependentní. Dále bylo zjištěno, že jsou tyto deriváty fotostabilní ve fosfátovém pufru po dobu jedné hodiny.

Dalším zkoumaným parametrem byla stabilita připravených derivátů ve vodě, která byla studována na vybraných derivátech při pH 4 a 8 po dobu 30 dnů a byl zaznamenán rozklad asi z 30 %.

Součástí práce jsou i studie reaktivity cílových látek s tripeptidem obsahujícím aminokyselinu s –SH či $–NH_2$ skupinou. Bylo zjištěno, že v případě použití ekvivalentu K_2CO_3 je cílová látka **6k** schopna se do 15 minut navázat.

Všechny látky byly studovány z hlediska jejich schopnosti projít přes buněčnou membránu a akumulovat se v mitochondriích. Testy byly provedeny na živých i fixovaných buňkách. Biologická studie ukázala, že látka **6a** vykazuje schopnost barvit

živé i fixované buňky. Bohužel však nebyla prokázána jejich schopnost nevymýt se z buňky po buněčné fixaci.

SEZNAM LITERATURY

1. Drummen, G. P. *Molecules* **2012**, *17*, 1420-3049.
2. The Nobel Prize in Chemistry 2008. 2014.
3. Braslavsky, S. E. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 293-465.
4. Chapman, G. N.; Walton, A. J. *Journal of Applied Physics* **1983**, *54* (10), 5961-5965.
5. Stokes, G. G. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, *142*, 463-562.
6. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy;* 2006.
7. Han, J.; Burgess, K. (1520-6890 (Electronic)).
8. Nunnari, J.; Suomalainen, A. *Cell* **2012**, *148* (6), 1145-1159.
9. Johnson, I. *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies;* 11 ed.; Life Technologies Corporation: 2010.
10. Rink TJ, F. A. U.; Tsien RY, F. A. U.; Pozzan, T. (0021-9525 (Print)).
11. Goncalves, M. S. (1520-6890 (Electronic)).
12. Chitarra, L. G.; Breeuwer, P.; Van Den Bulk, R. W.; Abee, T. *Journal of Applied Microbiology* **2000**, *88* (5), 809-816.
13. Han, J.; Burgess, K. (1520-6890 (Electronic)).
14. Wang, R.; Yu, C.; Yu, F.; Chen, L.; Yu, C. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2010**, *29* (9), 1004-1013.
15. Hasegawa, T.; Kondo, Y.; Koizumi, Y.; Sugiyama, T.; Takeda, A.; Ito, S.; Hamada, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (16), 6015-6019.
16. Bissell, R. A.; Bryan, A. J.; de Silva, A. P.; McCoy, C. P. *J. Chem. Soc. , Chem. Commun.* **1994**, (4), 405-407.
17. Lin, H. J.; Herman, P. F.; Kang JS, F. A. U.; Lakowicz, J. R. (0003-2697 (Print)).
18. Yogo, T.; Urano, Y.; Mizushima, A.; Sunahara, H.; Inoue, T.; Hirose, K.; Iino, M.; Kikuchi, K.; Nagano, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105* (1), 28-32.
19. Bradley, M.; Alexander, L. F.; Duncan, K. F.; Chennaoui, M. F.; Jones AC FAU - Sanchez-Martin, R.; Sanchez-Martin, R. M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18* (313), 1464.

20. Hilderbrand, S. A.; Kelly, K. A.; Niedre, M.; Weissleder, R. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (8), 1635-1639.

21. Liu, Y. S.; Sun, Y.; Vernier, P. T.; Liang, C. H.; Chong, S. Y. C.; Gundersen, M. A. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (7), 2872-2878.

22. Burns, A.; Ow, H.; Wiesner, U. *Chem Soc Rev* **2006**, *35* (11), 1028-1042.

23. McNamara, K. P.; Nguyen, T.; Dumitrascu, G.; Ji, J.; Rosenzweig, N.; Rosenzweig, Z. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (14), 3240-3246.

24. Elsliger, M. A.; Wachter RM, F. A. U.; Hanson GT, F. A. U.; Kallio, K. F.; Remington, S. J. (0006-2960 (Print)).

25. Wang, B.; Li, H. W.; Gao, Y.; Zhang, H.; Wu, Y. *J Fluoresc* **2011**, *21* (5), 1921-1931.

26. Dalapati, S.; Jana, S.; Alam, M.; Guchhait, N. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2011**, *160* (1), 1106-1111.

27. Yang, Y.; Yu, K.; Yang, L.; Liu, J.; Li, K.; Luo, S. *Sensors (Basel)* **2015**, *15* (1), 49-58.

28. Kumari, N.; Dey, N.; Bhattacharya, S. *Analyst* **2014**, *139* (10), 2370-2378.

29. Santos, C. I. M.; Oliveira, E.; Menezes, J. C. J. M.; Barata, J. F. B.; Faustino, M. A.; Ferreira, V. F.; Cavaleiro, J. A. S.; Neves, M. G.; Lodeiro, C. *Tetrahedron* **2014**, *70* (20), 3361-3370.

30. Murray, R. K.; Bender, D. A.; Botham, K. M.; Kennelly, P. J.; Rodwell, V. W.; Weil, P. A. *Harperova ilustrovaná biochemie;* The McGraw-Hill Companies, Inc.: 2009.

31. Frey, T. G.; Mannella, C. A. *Trends in Biochemical Sciences* **2000**, *25* (7), 319-324.

32. Johnson, L. V.; Walsh, M. L.; Chen, L. B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, *77* (2), 990-994.

33. Rafael, J.; Nicholls, D. G. *FEBS Letters* **1984**, *170* (1), 181-185.

34. Wu, E. Y.; Smith MT, F. A. U.; Bellomo, G. F.; Di, M. D. (0003-9861 (Print)).

35. Horster, M. F.; Wilson, P. D.; Gundlach, H. *Journal of Microscopy* **1983**, *132* (2), 143-148.

36. Voet, D.; Voetová, J. G. *Biochemie;* 1. české vyd. Praha ed.; Victoria Publishing: 1995.

37. Carter, P. Energy Production. *Midlands Technical College: Science Department* [online]. [cit. 2015-05-06]. Dostupné z: http://classes.midlandstech.edu/carterp/courses/bio225/chap05/lecture3.html.

38. Mitchell, P. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2011**, *1807* (12), 1507-1538.

39. Mozo, J.; Emre, Y. F.; Bouillaud, F. F.; Ricquier, D. F.; Criscuolo, F. (0144-8463 (Print)).

40. Brighton CT, F. A. U.; Hunt, R. M. (0009-921X (Print)).

41. Miller, R. J. *Trends in Neurosciences* **1998**, *21* (3), 95-97.

42. Green, D. R. *Cell* **1998**, *94* (6), 695-698.

43. Li, X.; Fang, P.; Mai, J.; Choi, E.; Wang, H.; Yang, X. F. *Journal of Hematology & Oncology* **2013**, *6* (1), 19.

44. OH-HAMA, T. A. M. I. *Orig Life Evol Biosph* **1997**, *27* (4), 405-412.

45. Rossier, M. F. *Cell Calcium* **2006**, *40* (2), 155-164.

46. Scaduto, J.; Grotyohann, L. W. *Biophysical Journal* **1999**, *76* (1), 469-477.

47. Mottram, L. F.; Forbes, S.; Ackley, B. D.; Peterson, B. R. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2012**, *8*, 2156-2165.

48. Perry, S. W.; Norman, J. P.; Barbieri, J.; Brown, E. B.; Gelbard, H. A. *Biotechniques* **2011**, *50* (2), 98-115.

49. Jakobs, S. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2006**, *1763* (5GÇô6), 561-575.

50. Giuliano, K. A.; DeBiasio, R. L.; Dunlay, R. T.; Gough, A.; Volosky, J. M.; Zock, J.; Pavlakis, G. N.; Taylor, D. L. *Journal of Biomolecular Screening* **1997**, *2* (4), 249-259.

51. White, B. H.; Kaczmarek, L. K. *The Journal of Neuroscience* **1997**, *17* (5), 1582-1595.

52. Hurd, T. R.; Prime, T. A.; Harbour, M. E.; Lilley, K. S.; Murphy, M. P. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (30), 22040-22051.

53. GeLu Line. *Microscopy Resource Center. Olympus America Inc.* [online] [cit. 2015-05-06]. Dostupné z: http://www.olympusmicro.com/galleries/confocal/cells/gelu/gelusb9.html.

54. Wu, S.; Song, Y.; Li, Z.; Wu, Z.; Han, J.; Han, S. *Anal. Methods* **2012**, *4* (6), 1699-1703.

55. Nobel Prize in Chemistry 1984. 2014.

56. Perrin, D. D.; Dempsey, B.; Serjeant, E. P. *pK a Prediction for Organic Acids and Bases;* Springer Netherlands: 1981.

57. Unpublished Work, 2014.

58. Park, K. K.; Oh, C. H.; Joung, W. K. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34* (46), 7445-7446.
59. Brulikova, L.; a Unpublished Work, 2013.
60. Mohseny, A. B.; Machado, I.; Cai, Y.; Schaefer, K. L.; Serra, M.; Hogendoorn, P. C. W.; Llombart-Bosch, A.; Cleton-Jansen, A. M. *Lab Invest* **2011**, *91* (8), 1195-1205.