

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY
LÉČIV**



**VAZBA AZAFTALOCYANINU NA 5'-KONEC OLIGONUKLEOTIDU –
„CLICK” CHEMIE**

Diplomová práce



Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Kamil Kopecký, Ph.D.

Hradec Králové 2013

Iveta Křížová

Chtěla bych tímto poděkovat PharmDr. Kamilovi Kopeckému, Ph.D. za jeho cenné odborné rady, pomoc, ochotu a hlavně trpělivost.

Tato práce vznikala za grantové podpory SVV 267 001.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne:

Iveta Křížová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Studentka: Iveta Křížová

Školitel: PharmDr. Kamil Kopecký, Ph.D.

Název diplomové práce:

Vazba azaftalocyaninu na 5'-konec oligonukleotidu – „click chemie”

Tato diplomová práce je zaměřena na syntézu derivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilů substituovaných v polohách 5 a 6 alkylaminovými substituenty. Poté byla provedena jejich cyklotetramerizace do finálních azaftalocyaninů. Zmíněné alkylaminové substituenty byly voleny tak, aby byla umožněna následná vazba azaftalocyaninů na 5'-konec oligonukleotidu modifikovaném terminálním alkynem za využití Huisgen 1,3-dipolární cykloadice.

Byl připraven a popsán azaftalocyanin nesoucí jednu hydroxylovou skupinu. Zamýšlenou strukturu obsahující jednu azidovou skupinu se nepodařilo připravit. Azaftalocyaniny se vyznačují důležitými fotofyzikálními a fotochemickými vlastnostmi. Proto byly charakterizovány NMR, IČ a hmotnostními spektry.

Teoretická část vysvětluje princip zhášení, praktické využití zhášení fluorescence a je zde uveden přehled v současnosti nejčastěji využívaných zhášečů fluorescence. Jejich porovnání výhodných a nevýhodných vlastností a nastínění vlastností ideálního zhášeče.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Student: Iveta Křížová

Supervisor: PharmDr. Kamil Kopecký, Ph.D.

Title of diploma thesis:

Binding of azaphthalocyanine on 5'-end of oligonucleotide – „click“ chemistry

This diploma thesis is focused on synthesis of pyrazin-2,3-dicarbonitrile derivatives that are substituted with alkylamine substituents in location 5 and 6. Then cyclotetramerization of these compounds to the final azaphthalocyanines was realized. Alkylamine substituents were chosen in the way, that bond on 5'-end of oligonucleotide with terminal alkyn modification could be performed according to Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition.

Azaphthalocyanine with one hydroxyl group was prepared and described. Preparation of intended structure with one azide group was unsuccessful. Azaphthalocyanines are characterized by important photophysical and photochemical properties. Therefore were these compounds characterized with NMR, IR and mass spectra.

In section Theory was explained the principle of quenching of fluorescence, practical use of quenching and overview of up to date the most commonly used quencher of fluorescence. There is also comparing of their positive and negative properties and little bit outlining of properties the ideal quencher.

OBSAH

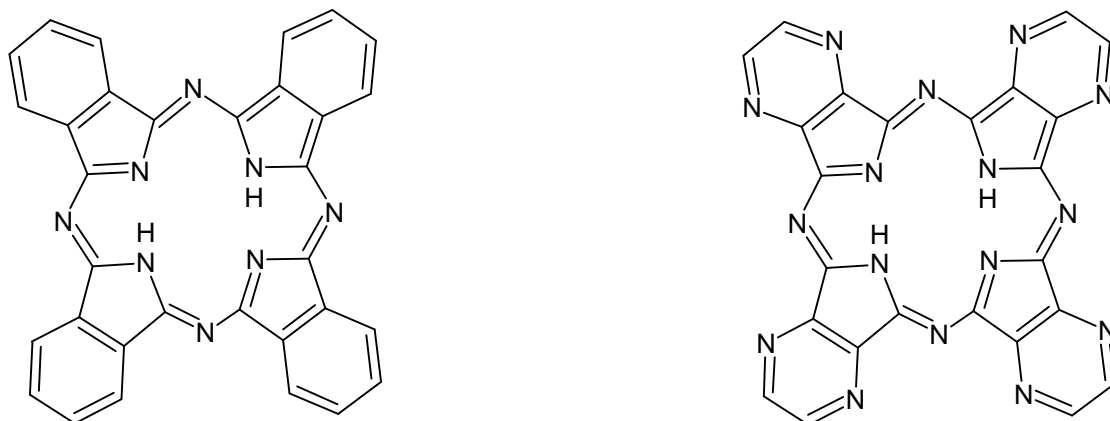
ABSTRAKT	4
ABSTRACT.....	5
OBSAH.....	6
1 SEZNAM ZKRATEK	7
2 ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	8
3 Teoretická část	9
3.1 Fluorescence	9
3.2 Zhášení fluorescence	10
3.3 Typy zhášení	10
3.3.1 Dynamické zhášení.....	10
3.3.2 FRET = Fluorescence (Förster) resonance energy transfer, fluorescenčně rezonanční přenos energie	11
3.3.3 Statické zhášení	11
3.3.4 Selfquenching, samozhášení.....	11
3.3.5 Photobleaching, fotovybělování	12
3.4 Aplikace zhášení fluorescence ve fluorescenčních sondách	12
3.4.1 Přilehlé sondy	12
3.4.2 5'-nukleasové sondy (TaqMan)	12
3.4.3 Molekulární majáky.....	13
3.4.4 Strand-displacement sondy (Yin-Yang sondy).....	13
3.5 Běžně používané zhášeče	14
3.5.1 Ideální zhášeč	14
3.5.2 Zástupci běžně používaných zhášečů	14
4 METODICKÁ ČÁST	24
4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti organických azidů	24
4.2 Příprava organických alifatických azidů	25
4.2.1 Přenosem celé azidové skupiny na:	25
4.2.2 Přenos diazo-skupiny na aminy	28
4.3 Důležité reakce organoazidů	28
4.3.1 Cu(I)-katalyzovaná Huisgenova cykloadice („click“ reakce)	28
4.3.2 Staudingerova reakce (crosslinking, biokonjugace).....	30
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
5.1 Příprava 5-chlor-6-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]pyrazin-2,3- dikarbonitrilu (1)	33
5.2 Příprava 5-diethylamino-6-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]pyrazin-2,3- dikarbonitrilu (2)	33
5.3 Příprava 5-[4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl]-6-(diethylamino)pyrazin-2,3- dikarbonitrilu (3)	34
5.4 Příprava 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)	35
5.5 Cyklizace 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4) a 5-[4-(2- azidoethyl)piperidin-1-yl]-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)	35
5.6 Cyklizace 5-diethylamino-6-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]pyrazin-2,3- dikarbonitrilu (2) s 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)	36
5.7 Příprava 2-[4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis- (diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (7)	37
6 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
7 ZÁVĚR.....	43
8 LITERATURA	44

1 SEZNAM ZKRATEK

ADMP	2-azido-1,3-dimethylimidazolinium hexafluorofosfát
AzaPc	azaftalocyanin
DCM	dichlormethan
DEAD	diethyl-azodikarboxylát
DIPEA	diisopropylethyl amin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethyl sulfoxid
DPPA	difenylfosforyl azid
DQ	dark quenchery
FRET	Fluorescent (Förster) resonance energy transfer, fluorescenčně rezonanční přenos energie
NIR	spektrum blízké infračervené oblasti (700 až 2500 nm)
Q	quencher, zhášec
TBTA	tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMDSO	tetramethylidisiloxan
TRP	tryptofan
TYR	tyrosin

2 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Azaftalocyaniny jsou makrocyclické planární struktury s rozsáhlým systémem konjugovaných π -vazeb. Výchozí strukturou jsou ftalocyaniny, kde je jeden nebo více atomů uhlíku nahrazen atomem dusíku (viz. Obr.1). Výše zmiňovaný systém konjugovaných vazeb dodává těmto sloučeninám odolnost vůči vlivům okolního prostředí a rovněž zbarvení. Konkrétně u sloučenin, kterými se tato práce zabývá, je to fialová barva.



Obrázek 1: Struktura ftalocyaninu a azaftalocyaninu

Azaftalocyaniny mohou do svého centra chelatovat různé kationty kovů. To se potom odráží na jejich vlastnostech, např. emitují fotony ve formě fluorescence, dále se mění poloha pásů v absorpčních spektrech, získávají schopnost produkovat singletový kyslík a mohou také získat různé oxidoredukční vlastnosti.

Je-li na periférii přítomna terciální aminoskupina v konjugaci s azaftalocyaninovým makrocylem dochází k tzv. intramolekulárnímu přenosu náboje, který je zodpovědný za zhášení excitovaných stavů a tím vymizení produkce singletového kyslíku a fluorescence. To pak umožňuje tyto sloučeniny použít v hybridizačních sondách jako zhášeče fluorescence.⁽¹⁾

Cílem této práce bylo připravit deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu s alkylaminovými substituenty nesoucími jednu azidovou skupinu tak, aby byla umožněna následná vazba vzniklého azaftalocyaninu na 5'-konec oligonukleotidu modifikovaném terminálním alkynem, pomocí cykloadiční reakce – „click“ reakce.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Fluorescence

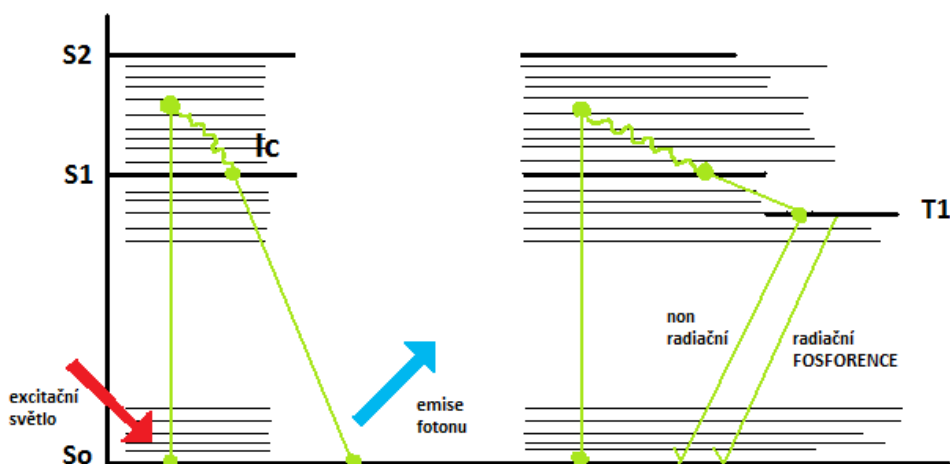
Při světlené excitaci je energie fotonu absorbována elektronem fluoroforu, což zvyšuje jeho energetickou hladinu a převádí jej do excitovaného stavu. Během tohoto stavu je část energie rozptýlena. Dochází totiž k vibrační relaxaci a **vnitřní konverzi (Ic)**, elektron klesá do nejbližšího singletového stavu S_1 a fluorescenční přechod se uskutečňuje až odtud. Tento jev odpovídá tzv. **Kashovu pravidlu**.⁽²⁾

Ze singletového stavu S_1 může být energie přenesena na jinou molekulu. Zbytek energie (pokud nedošlo k přenosu na další částici) je vyzáren jako foton. Tento jev se nazývá **fluorescence**. Elektron zbavený energie klesá na svou základní energetickou hladinu, což představuje tzv. **dohasínání fluorescence** a děje se rychlostí okolo 10^{-9} s.

Emitovaný foton pak nese méně energie a tudíž má delší vlnovou délku, než absorbovaný foton.

Excitace a emise jdou neustále cyklicky za sebou, dokud není fluorofor ireversibilně poškozen.

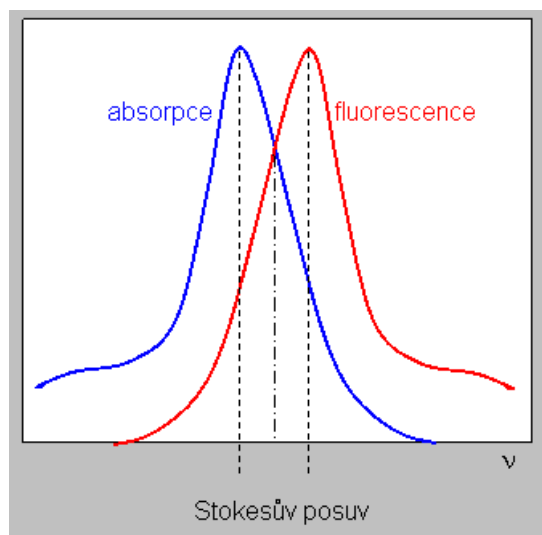
Průběh fluorescence popisuje **Jablonského diagram**.^(2,3)



Obrázek 2: Jablonského diagram popisuje pozici elektronu během fluorescence

Vyjádření závislosti intenzity absorpce nebo fluorescence (emise) na konstantní vlnové délce se nazývá **absorpční nebo emisní spektrum**. Lze z nich určit pro každý fluorofor jeho absorpční a emisní maximum, tedy hodnoty vlnové délky, kdy tyto veličiny dosahují nejvyšších hodnot.

Mezi absorpčním a fluorescenčním pásem velké části organických molekul platí **zrcadlová symetrie**. Je dána tím, že uspořádání jádra během základního a excitovaného stavu je stejné a tedy se pásy liší pouze polohou na grafu. Tento rozdíl nazýváme **Stokesův posun**.⁽²⁾



Obrázek 3: Zrcadlová symetrie pásem a vzájemná poloha grafů – Stokesův posuv⁽²⁾

3.2 Zhášení fluorescence

Je to proces, kterého se účastní dvě molekuly – **fluorofor** a **zhášeč** neboli **quencher (Q)**, a ve výsledku se snižuje kvantový výtěžek fluorescence (intenzita), bez změny fluorescenčního emisního spektra.⁽²⁾

3.3 Typy zhášení

3.3.1 Dynamické zhášení

Excitovaný fluorofor se setká v roztoku s jinou molekulou a dochází k nezářivému přechodu zpět do základního stavu S_0 . Při tomto procesu nedochází k chemické změně ani jedné z molekul.

Intenzita emise a střední doba zhášení je redukována s rostoucí koncentrací zhášeče a pravděpodobnost kontaktu se zhášečem je přímo úměrná jeho koncentraci.

Tento typ zhášení je indukovatelný teplotní změnou. Při zvyšující se teplotě se zrychlují pohyby molekul v médiu a tím se zvyšuje pravděpodobnost kolize zhášeče a fluoroforu.⁽⁴⁾

Snížení intenzity fluorescence je popsáno **Stern-Volmerovou rovnicí**⁽²⁾:

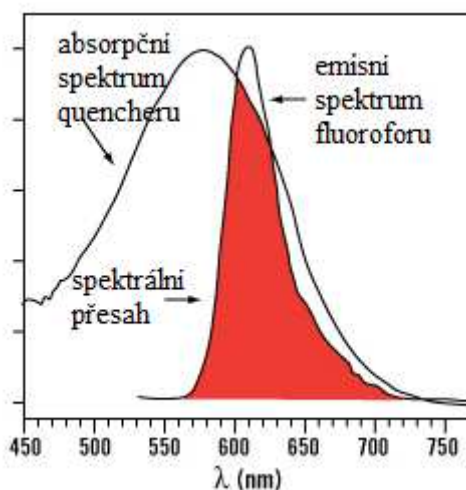
$$\frac{\varphi_0}{\varphi} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 C_q$$

- kde:
- φ_0 je kvantový výtěžek za nepřítomnosti zhášeče
 - φ je kvantový výtěžek za přítomnosti zhášeče
 - τ_0 je doba dohasínání fluorescence bez zhášeče
 - τ je doba dohasínání v přítomnosti zhášeče
 - k_q je bimolekulární zhášecí konstanta (typické hodnoty 10^9 - $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
 - C_q je koncentrace zhášeče

3.3.2 FRET = Fluorescence (Förster) resonance energy transfer, fluorescenčně rezonanční přenos energie

Jedná se o rezonanční přenos energie z excitovaného donoru na elektron akceptoru, elektron donoru klesá do základního stavu bez emise fotonu, tedy bez fluorescence, non-radiačně.

Tento proces je silně závislý na **dipólové orientaci** obou molekul a na **vzdálenosti** mezi nimi. Další požadavek k úspěšnému průběhu, je **dostatečný přesah spekter** – emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru.⁽⁴⁾



Obrázek 4: Přesah emisního spektra fluoroforu a absorpčního spektra zhášče⁽⁵⁾

3.3.3 Statické zhášení

Fluorofor a zháščeč při svém kontaktu vytváří nefluorescenční komplex, tzv. **intermolekulární dimery**. Dochází k indukovaným změnám vlastností fluoroforu, zapříčiněných blízkostí zháščeče.

S rostoucí teplotou zhášení klesá, jelikož zvýšená teplota vede k disociaci slabých vazebných interakcí mezi komplexy zháščeč-fluorofor.

Když je zháščeč pevně fixován v pozici blízko excitovaného fluoroforu (např. ve zmražené matici nebo zeolitu), jedná se o modifikovaný typ statického zhášení. Tato situace je označována jako **Perrinův model zhášení**. Tento model využívá tzv. **sféru efektivního zhášení**, což je prostor okolo fluoroforu, v němž zháščeč efektivně snižuje intenzitu fluorescence fluoroforu. Jakmile je vzdálenost mezi zháščečem a fluoroforem větší než je sféra efektivního zhášení, nemá zháščeč žádný vliv na fluorofor.⁽⁴⁾

3.3.4 Selfquenching, samozhášení

Samozhášení je fenomén, kdy je fluorofor zhášen sám sebou. Tato situace nastává při vysoké koncentraci fluoroforu v roztoku. Dochází ke koliznímu zhášení mezi molekulami fluoroforu. Mezi excitovanými molekulami a molekulami v základním stavu dochází k neelastickým srážkám. Molekuly pak jen absorbují záření, ale neemitují, energie se vyloučí ve formě tepla.⁽⁶⁾

3.3.5 Photobleaching, fotovybělování

Fotovybělování je ireversibilní destrukce fluoroforu způsobená buď prolongovaným vlivem excitačního zdroje anebo vystavení excitačnímu světlu velmi vysoké intenzity. V průběhu analýzy je tento jev nežádoucí.

Může být minimalizován použitím nejnižší možné intenzity excitačního světla po nejnutnější dobu, kdy výtěžek fluorescence bude ještě dobře detekovatelný.

Další možností je použití fotostabilnějších fluoroforů nebo látek, které budou světelné podmínky pro fluorofor tlumit a tak jej bránit před fotovybělením.⁽⁷⁾

3.4 Aplikace zhášení fluorescence ve fluorescenčních sondách

Fluorescenční sondy jsou sestaveny pro detekci specifických sekvencí nukleových kyselin, proteinů, jejich komplexních formací a konformačních změn. Rovněž se mohou používat k monitorování biologických procesů *in vivo*.

Dále v textu budou přiblíženy vlastnosti fluorescenčních hybridizačních sond, které se využívají k detekci nukleových kyselin (NK).

Rozlišujeme **4 základní typy**, které pracují na principu FRET nebo kontaktním zhášením: **přilehlé sondy**

5'-nukleasové sondy

molekulární majáky

strand-displacement sondy

3.4.1 Přilehlé sondy

Jsou tvořeny dvěma samostatnými řetězci, které se během detekce váží k částem řetězce obklopujícím cílovou sekvenci nukleové kyseliny (NK). Jeden řetězec je označen fluoroforem na 3'-konci, druhý je označen zhášečem na 5'-konci. Při hybridizaci musí být řetězce v takové vzdálenosti od sebe, aby došlo účinně k rezonančnímu přenosu energie.

Hybridizace sondy a cílové NK je zachycována měřením buď snížení donorového fluorescenčního signálu, nebo zvýšení akceptorového fluorescenčního signálu.⁽⁴⁾

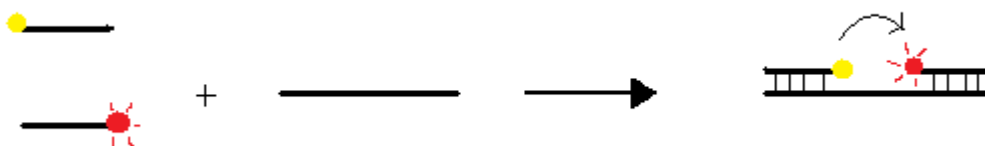


Schéma 1: Přilehlá sonda před hybridizací a po navázání na cílovou nukleovou kyselinu

3.4.2 5'-nukleasové sondy (TaqMan)

Jsou to jednořetězcové hybridizační sondy. Pracují na principu 5'-3'-exonukleasové aktivity Taq polymerasy, která štěpí sondu během hybridizace s komplementární cílovou sekvencí. Skládají se z fluoroforu kovalentně vázaného k 5'-konci

oligonukleotidové sondy a zhášecího vázaného k 3'- konci. Zhášení je realizováno prostřednictvím FRET.

Jakmile dojde k rozštěpení řetězce sondy, vlivem polymerasy, poruší se potřebná vzdálenost mezi fluoroforem a zhášecím, což vede k obnově fluorescence fluoroforu. (Viz. Schéma 2). S každým dalším cyklem je fluorescenční signál vyšší, což indikuje akumulaci cílové DNA. ⁽⁴⁾

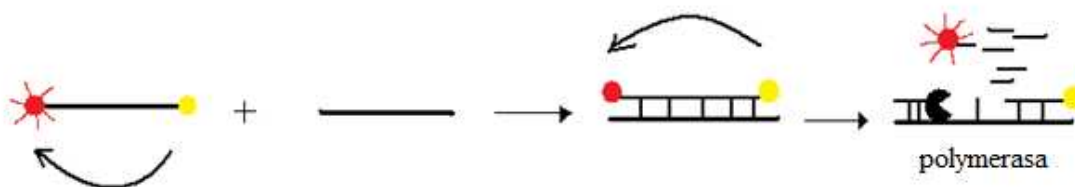


Schéma 2: 5'-nukleosová sonda před hybridizací a následné rozštěpení sondy vlivem polymerasy

3.4.3 Molekulární majáky

Jednořetězcové hybridizační sondy, které mají **vlásečkový tvar** (viz. Schéma 3). Sondu tvoří střední část této struktury, tzv. smyčka (15 až 30 nukleotidů) a je komplementární k cílové sekvenci v DNA. Sonda je pak vmezeřená mezi dvě ramena. Délka ramen je asi 5 až 7 nukleotidů. Ramena jsou k sobě komplementární a nesouvisí ani se sekvencí sondy, ani s cílovou sekvencí.

Fluorofor je přichycen ke konci jednoho ramene a nefluorescenční zhášecí je přichycen ke konci druhého ramene. Díky malé vzdálenosti těchto dvou konců dochází mezi nimi ke kontaktnímu zhášení.

Když se sonda setká s cílovou DNA nebo RNA molekulou, dojde ke konformační změně sondy, což má za následek rozvolnění vlásečkové struktury a oddálení fluoroforu a zhášecího. Jakmile se tyto dvě molekuly od sebe vzdálí, ukončí se kontaktní zhášení a je obnovena fluorescence. ⁽⁴⁾

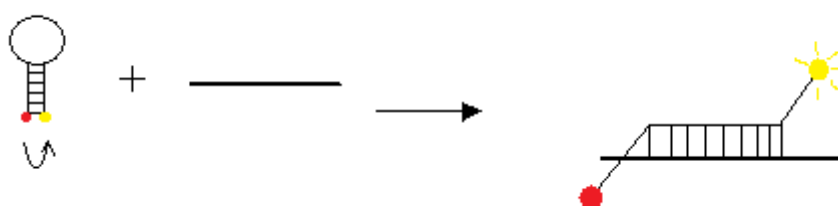


Schéma 3: Vlasečkový tvar majáku a následné rozvolnění struktury po hybridizaci sondy s cílovou sekvencí

3.4.4 Strand-displacement sondy (Yin-Yang sondy)

Jsou tvořeny dvěma komplementárními oligonukleotidovými řetězci, jeden je označen fluoroforem, druhý zhášecím. Když jsou tyto dva řetězce hybridizovány, dostává se fluorofor a zhášecí do potřebné vzdálenosti a dochází ke kontaktnímu zhášení. V přítomnosti cílové nukleové kyseliny s ní jedna sonda utvoří stabilnější hybrid. Sondy jsou v takovém případě od sebe odděleny. Dochází tedy k výměně řetězce sondy za řetězec cílové NK, odtud název sondy. ⁽⁴⁾

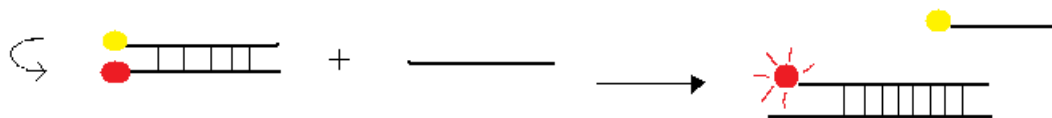


Schéma 4: Hybridizovaná sonda nevykazuje fluorescence, po výměně řetězce za cílovou sekvenci je fluorescence obnovena

3.5 Běžně používané zhášecí

3.5.1 Ideální zhášec

Mezi vlastnosti ideálního zhášecí by měla patřit **absence vlastní fluorescence**. Pokud totiž zhášecí vykazuje fluorescenční vlastnosti, může tato fluorescence interferovat s emisním spektrem fluoroforu a zkreslovat tak výsledky měření. Rovněž tato situace vyžaduje úpravu měřicího zařízení, např. použitím filtru, jak tomu bývá při použití kupříkladu TAMRA.

K dalším vlastnostem by měla patřit **univerzálnost pro všechny fluorofory**. Některé zhášecí jsou kompatibilní téměř se všemi fluorofory, jsou ale i takové, které jsou vysoce specifické jen pro určitý fluorofor.

Buňky, tkáně, blotting membrány a další chemické sloučeniny mají autofluorescenční vlastnosti, které mohou interferovat s měřenou fluorescencí. V NIR (near infra red spektru - 700 až 2500 nm) je autofluorescenční pozadí dramaticky redukováno. Kvůli tomu je ideální, když zhášecí pracuje v **širším záběru spekter**, včetně NIR, je tak zvýšena detekční citlivost.

Zhášecí by také **neměl produkovat reaktivní částice**, které by narušovaly reakční prostředí. Protože kupříkladu vysoce reaktivní singletový kyslík může poškodit sondu.⁽³⁾

3.5.2 Zástupci běžně používaných zhášecí

3.5.2.1 Molekulární O₂

Studie Lakowicze a Webera (1973) jako první navrhl, že by molekulární kyslík mohl snadno penetrovat do proteinové struktury a zhášet tak fluorescenci aminokyselin. Toto tvrzení bylo následně potvrzeno Calhounem a kol. Kyslík opravdu penetruje do struktury proteinu a zháší dokonce i nevystavené tryptofanové jednotky.

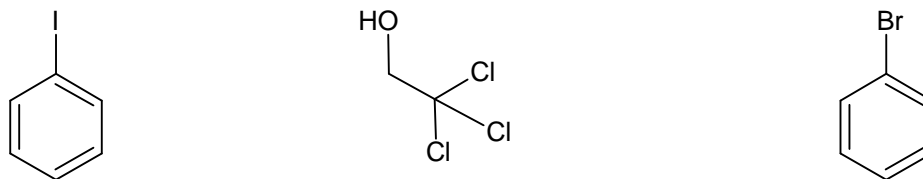
Mechanismus zhášení je pravděpodobně způsoben nezářivým (non-radiačním) přechodem barviva do tripletového stavu (**tzv. intersystémovou konverzí**).

3.5.2.2 Atomy halogenů – brom, jód

Používají se halogenované sloučeniny jako jodbenzen, trichlorethanol nebo brombenzen. Ke zhášení dochází v důsledku intersystémové konverze barviva do tripletového stavu. Jedná se o tzv. **efekt těžkého atomu**.

Sloučeniny obsahující chlor mají pravděpodobně jiný mechanismus zhášení. Chlorované uhlovodíky velmi účinně zháší indoly, karbazoly a jejich deriváty. Zhášení v tomto případě má mechanismus přenosu elektronu fluoroforu ke zhášeči.

Chloridový ion je známý svou schopností zhášet fluorescenci chininu.

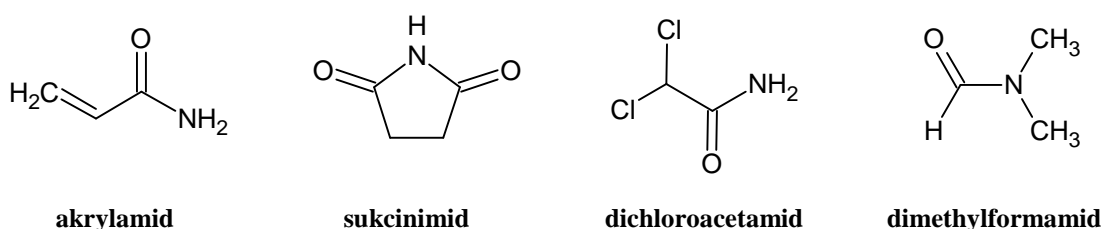


Obrázek 5: Přehled struktur zhášečů obsahujících halogen v molekule
Struktura jodbenzenu, 2,2,2-trichlorethanolu a brombenzenu

3.5.2.3 Zhášeče s malou molekulou

Používají se ke zhášení fluorescence aminokyselin v proteinech, hlavně tryptofanových jednotek. Začaly se používat kvůli domněnce, že do proteinových struktur dobře pronikají jen malé molekuly a tím by mohlo být umožněno zhášení i těžko dostupných tryptofanových jednotek nevystavených na povrchu, ke kterým se zhášeče s velkou molekulou většinou nedostaly.⁽⁶⁾

Tato skutečnost nebyla potvrzena, byly navrženy zhášeče s většími molekulami a nevystavené tryptofanové jednotky byly i přes to zhášeny.



Obrázek 6: Přehled struktur zhášečů s malou molekulou

3.5.2.4 Dark quenchers (DQ)

Při přijetí energie od fluoroforu tyto zhášeče non-radiačně klesají do základního stavu. Tento jev nazýváme „**dark quenching**“. DQ nejsou schopny radiační emise. Molekula se energie zbavuje vibracemi, uvolněním tepla. Jelikož se v sondě nachází zhášeč v koncentraci mikromolů, je teplo z tohoto přenosu tak zanedbatelné, že neovlivňuje celkovou teplotu reakční soustavy.

DQ jsou běžně používány pro FRET typ fluorogenních sond, pro detekci proteasové aktivity, hybridizaci nukleových kyseliny a real-time PCR.

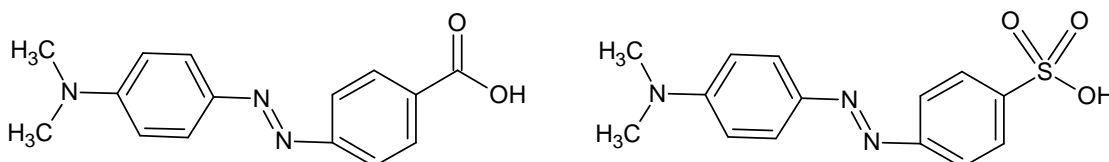
Jedná se o širokou skupinu rozmanitých struktur, ale většinou v molekule obsahují diazo skupinu.⁽⁸⁾ V následujícím textu jsou uvedeni někteří zástupci.

Dabsyl (dimethylaminoazobenzensulfonová kyselina)

Absorbuje v zeleném spektru (520 až 565 nm) a je často používán s fluoresceinem. Obsahuje v molekule sulfonylovou skupinu.

Dabcyl (Dimethylaminofenylazobenzenová kyselina)

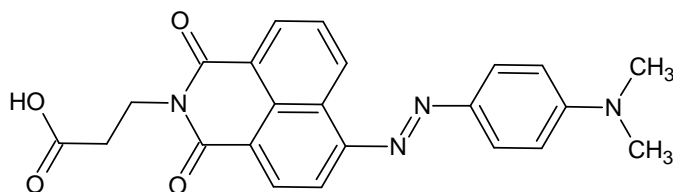
Má téměř identické absorpční spektrum jako Dabsyl. Běžně se používá do molekulárních majáků a scorpion primerů.



Obrázek 7: Struktura Dabcyl a Dabsyl liší se pouze v substituci na benzenovém jádře ^(9,10)

MPQ quencher – multiple pathway quencher

Jsou to zhasěče, které mají ve své struktuře několik donorových a akceptorových skupin, což rozšiřuje jejich absorpční spektrum a zvyšuje zhasěcí účinnost. Předlohou k základní struktuře byl Dabsyl.⁽¹¹⁾



Obrázek 8: Struktura MPQ 1

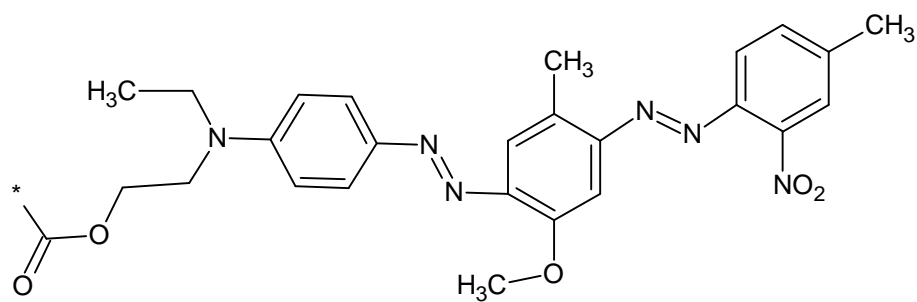
BHQ - Black Hole Quenchery

Jsou to polyaromatické diazosloučeniny. Jsou hydrofobní, po navázání na oligonukleotid se stávají ve vodě rozpustné, tak jako většina barviv. Jsou to pravé dark quencher, nevykazují tedy žádnou přirozenou fluorescenci.

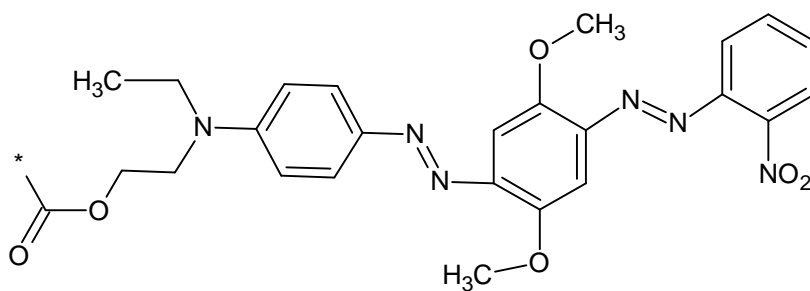
Poskytují sérii zhasěčů která pokrývá celé viditelné světelné spektrum a NIR (400-800 nm). Jejich absorpční maxima jsou: BHQ0: 493 nm; BHQ1: 534 nm; BHQ2: 578 nm; BHQ3: 672 nm.

Mohou být použity k multiplexním analýzám. Velmi často se používají v qPCR sondách.⁽¹²⁾

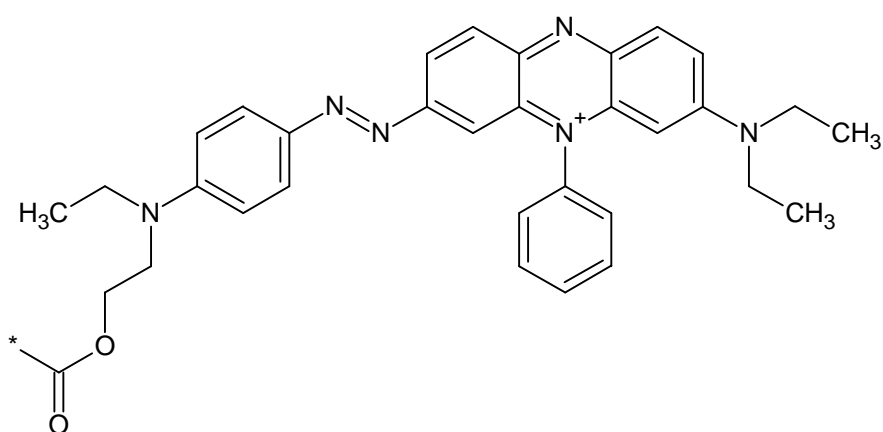
Mechanismus zhasení je na základě FRET a také vykazují tvorbu komplexů s fluoroforem, tedy zhasí i staticky.



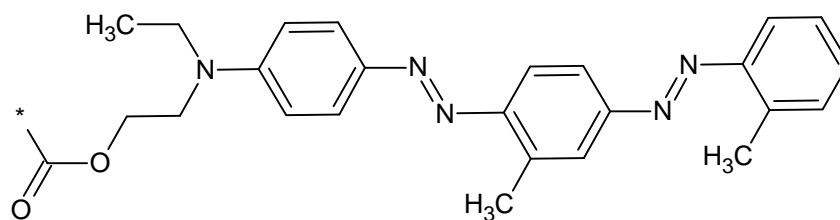
Obrázek 9: Struktura BHQ1^(12,13)



Obrázek 10: Struktura BHQ2^(12,13)



Obrázek 11: Struktura BHQ3^(12,13)

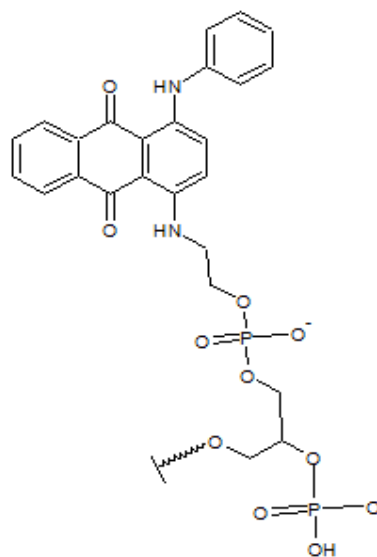


Obrázek 12: Struktura BHQ0⁽¹³⁾

Iowa black RQ

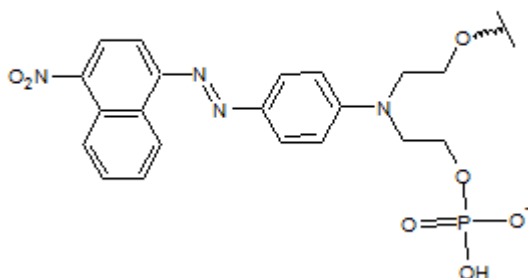
Absorbuje v oranžovo-červené části spektra. Je odolný i vůči náročnějším reakčním podmínkám (pH, teplota).

Obrázek 13: Struktura Iowa Black RQ ⁽¹⁴⁾



Iowa black FQ

Absorbuje v zeleno-žluté části spektra.

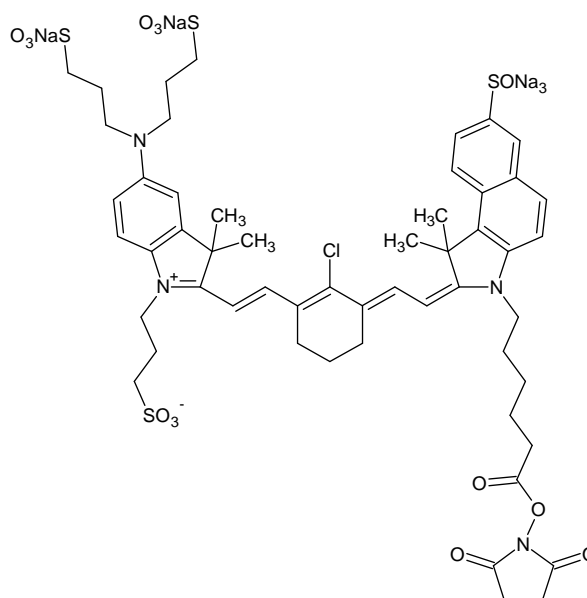


Obrázek 14: Struktura dark quencheru Iowa Black FQ ⁽¹⁴⁾

IRDyes

Zhřší v rozsahu 500-900 nm, tedy v oblasti VIS a NIR (near infra-red), odtud název IR.

Základní strukturou je **cyanin**, který je na indolu substituován amino skupinou. Tato substituce eliminuje fluorescenci cyaninu a vede také k mnohem širšímu absorpčnímu pásu. Cyaniny v roztoku formují dimerové asociace, ochotně se rozpouští v methanolu a vodných roztocích solí. To usnadňuje vázání na biomolekuly a purifikační procesy a eliminuje nežádoucí nespecifické vazby s cílovými molekulami.



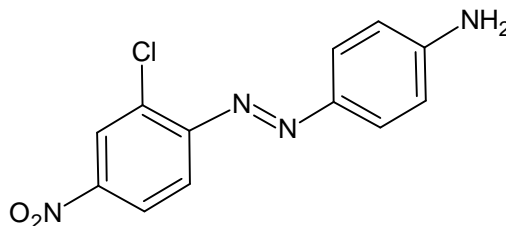
Obrázek 15: IRDye QC-1 NHS ester ⁽¹⁵⁾

V kyselém prostředí (1%-ní roztok kyseliny octové v methanolu) dochází k protonizaci amino skupiny a barvivo se stává fluorescenční. V běžně používaných podmínkách při biologickém výzkumu je ale tato protonizace zanedbatelná.

Eclipse quencher

Absorpční maximum tohoto quencheru je 522 nm. Zháší fluorescenční barviva emitující v nižších vlnových délkách, pro fluorofory, jako například cyaniny, tedy není příliš vhodný zhášec. Je součástí tzv. **MGB Eclipse sondy**, známé také jako Quanti sonda.

V těchto sondách je používán v kombinaci s **dihydrocyklopyrroloindol tripeptidem** – tzv. **minor groove binderem (MGB)**, což je podjednotka používaná u non-fluorescenčních quencherů při tvorbě sondy. Ovlivňuje bod tání sondy a tím umožňuje navržení kratší sondy a tedy sondy s vyšší specifitou detekce.



Obrázek 16: Struktura Eclipse quencheru, 4-[(2-chloro-4-nitro-phenyl)-azo]anilin⁽¹⁶⁾

Shrnutí skupiny DQ

Jak je uvedeno výše, některé DQ zasahují jen do určité oblasti absorpčního spektra a některé zháší v širší oblasti. Použití zhášeců, jejichž spektrum zasahuje až do NIR spektra má několik výhod. V NIR je extrémně potlačena autofluorescence, což výrazně redukuje fluorescenci v pozadí, které interferuje s fluorescencí barviv a snižuje tak přesnost detekce.

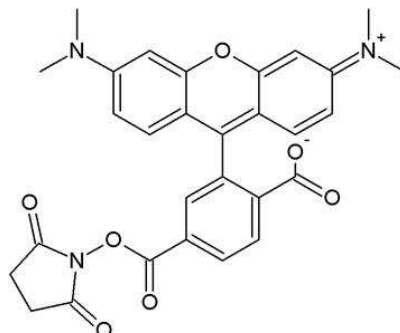
Pro *in vivo* zobrazovací aplikaci, jsou NIR analýzy také benefitní, kvůli tomu, že světlo o vlnové délce 650 - 900 nm lépe penetruje tkáněmi.

Rovněž při tak širokém spektru zhášení je možno párovat tyto zhášec s téměř všemi barvivy.

3.5.2.5 TAMRA – tetramethylrhodamin

Tento zhášeč byl dříve hojně používán, vykazuje ale určitý autofluorescenční signál, tudíž bylo potřeba při analýzách používat filtry, aby nedocházelo k narušování průběhu měření. V dnešní době začíná být nahrazován novějšími zhášeči, například ze skupiny dark quencherů, které tyto nevýhody nemají.

Nejčasteji se používá v TaqMan sondě.⁽⁴⁾ Tyto sondy s TAMRA jsou relativně dlouhé (30-40 bází), což je nevýhoda, jelikož čím delší sonda je, tím méně je detekce specifická. Zkrácení délky sondy je možno zajistit použitím již výše zmíněných MGB binderů, které zvyšují T_m sondy, což dovoluje zkrátit sondu. T_m pro výrobu kratších sond je 65-67 °C.



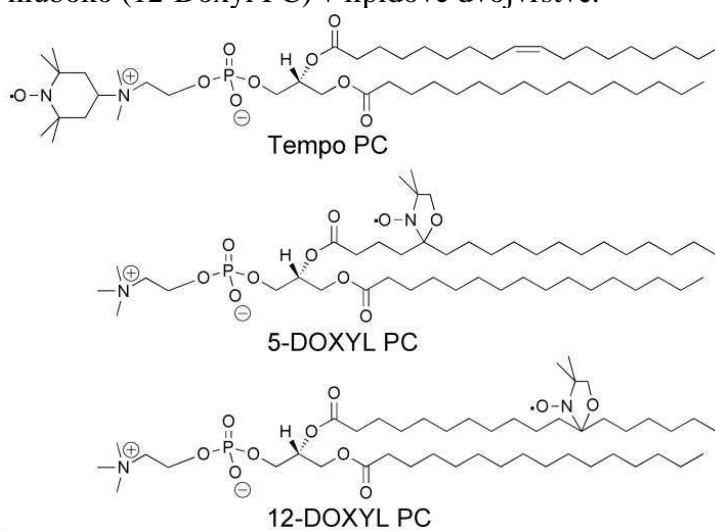
Obrázek 17: Struktura karboxytetramethylrhodamin sukcinimidyl esteru ⁽¹⁸⁾

3.5.2.6 Lipofilní quencher

Tempo-PC, *5-Doxyl PC* a *12-Doxyl PC*

Jedná se o fosfolipidy značené **nitroxidovou** skupinou, které jsou v době zhasení umístěny do lipidové dvojvrstvy buněčné membrány. Právě nitroxid je zodpovědný za jejich schopnost zhasět. Používají se ke zhasení fluoroforů obsažených v membráně a tedy ke studiu polohy těchto fluoroforů.

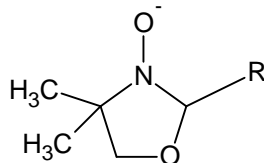
Některé jsou umístěny na povrchu (*Tempo PC*), některé ve středu (*5-Doxyl PC*) a další hluboko (*12-Doxyl PC*) v lipidové dvojvrstvě.⁽¹⁹⁾



Obrázek 18: **TEMPO PC** - 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfotempocholin,
5-DOXYL PC - 1-palmitoyl-2-stearoyl-(5-doxyl)-*sn*-glycero-3-fosfocholin,
12-DOXYL PC - 1-palmitoyl-2-stearoyl-(12-doxyl)-*sn*-glycero-3-fosfocholin ⁽¹⁹⁾

Doxylem značená kyselina stearová (DSA 5 a DSA 12)

Mastné kyseliny 5-doxylstearová a 12-doxylstearová jsou pro studium zhášení umístěny v lipidové dvojvrstvě anebo ve sférových lipoproteinových částicích a sleduje se jejich zhášení fluorescence, což pak poskytuje informace o umístění a membránové přístupnosti zhášených fluoroforů (např. tyrosinu, rhodopsinu)⁽²⁰⁾

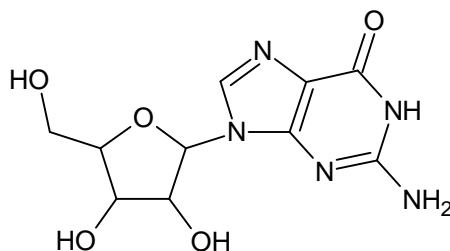


Obrázek 19: Základ struktury doxylové skupiny tvoří oxazolidonový skelet

3.5.2.7 Purinové nukleosidy

Nejsou to běžně používané zhášedce, přesto mají schopnost zhášet. Při navrhování oligonukleotidové sondy musíme brát na tuto skutečnost ohledy. Vyhýbáme se umístění fluoroforové značky do těsné blízkosti guanosinu, dochází totiž k nechtěnému fenoménu, kdy je signifikantně snížen kvantový výtěžek fluorescence. Záleží na typu fluoroforu, ale může to být až o 40%.

Obecně zháší fluorofory s excitační vlnovou délkou okolo 500 až 550 nm. Nejúčinnější zhášedce je guanosin, za ním adenosin, cytidin a thymidin.⁽²¹⁾



Obrázek 20: Struktura guanosinu

3.5.2.7.1 Azaftalocyaniny (AzaPc)

AzaPc a další podobné látky ze skupiny ftalocyaninů vykazují výrazné fluorescenční vlastnosti a rovněž produkci singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). Tyto skutečnosti byly zkoumány, využity (např. k fototerapii) a rovněž potlačeny, což vedlo k umožnění aplikace azaPc jako zhášeců fluorescence.⁽¹⁾

Syntéza substituovaných azaftalocyaninů byla cílem této diplomové práce.

3.5.2.7.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti AzaPc

Jsou to planární makrocycly s rozsáhlým systémem konjugovaných dvojných vazeb. Jsou schopny absorbovat světelnou energii různých vlnových délek, této energie se molekula může zbavit několika způsoby, jak bylo uvedeno výše. Fosforescence a uvolnění tepla jsou možnosti, které pro tuto práci nemají význam. Dále může být energie emitována ve formě fotonu, tento jev se nazývá fluorescence.

Látka nacházející se v tripletovém stavu může předávat energii kyslíku fotoprocesem typu II, což vede k produkci jeho vysoce reaktivní formy, tzv. singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$).

Rovněž může dojít k nezářivému intramolekulárnímu přenosu náboje.

Výskyt popsaných relaxačních stavů je výrazně ovlivněn strukturou AzaPc. Důležitá je přítomnost a druh centrálního kationtu, složení makrocyclického jádra a rovněž hrají důležitou roli periferní substituenty.

Jako centrální kationty se používají hlavně Zn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{2+} . U zinečnatých AzaPc je potlačena fluorescence a vykazují vysokou produkci $^1\text{O}_2$. U hořečnatých AzaPc je tomu přesně naopak. Je to způsobeno tzv. efektem těžkého atomu, kdy chelatace atomu s vyšším atomovým číslem vede k upřednostnění mezisystémového přechodu a tedy vzniku $^1\text{O}_2$.

Periferní substituenty hrají důležitou roli v ovlivnění vlastností AzaPc. Mezi nejdůležitější periferní substituenty patří alkylamino- a dialkylamino- deriváty. Volný elektronový pár dusíku se totiž zapojuje do konjugace a po excitaci se okamžitě přerozděluje hustota náboje v molekule a molekula se rychle navrácí do základního stavu. Dochází tedy k nezářivému intramolekulárnímu přenosu náboje. Tyto látky pak vykazují téměř nulové hodnoty emise fluorescence a $^1\text{O}_2$. Ke zhášecímu efektu stačí pouze jedno donorové centrum v molekule.⁽¹⁾

3.5.2.7.1.2 Využití AzaPc ve fotodynamické terapii

AzaPc produkují $^1\text{O}_2$. Když se tato vysoce reaktivní forma dostane do organismu, ničí okolní biomolekuly, což vede k narušení jejich funkčnosti. Jelikož doba existence $^1\text{O}_2$ je velmi krátká, difunduje do velmi malé vzdálenosti. To zaručuje cílené působení a minimální poškození okolní tkáně. Tato terapie nachází využití hlavně u nádorových onemocnění, ale i v dermatologii a oftalmologii.

3.5.2.7.1.3 Využití azaftalocyaninů jako zhášeců fluorescence

Díky intramolekulárnímu přenosu náboje u **alkyl- a dialkylaminoazaftalocyaninů** nemají tyto látky žádné autofluorescenční vlastnosti a rovněž neprodukují reaktivní částice. Patří tedy k dark quencherům. K dalším výhodným vlastnostem patří široké absorpční spektrum (300-740 nm), tudíž mohou zhášet prakticky celou škálu dnes používaných fluoroforů. Tyto vlastnosti je řadí k ideálním univerzálním zhášecům fluorescence.

K ověření zhášecí účinnosti byla provedena hybridizační studie zinečnatého AzaPc s šesti fluorofory, pokrývajícími celé spektrum využívané v DNA analýze (od 520 nm až po 703 nm).

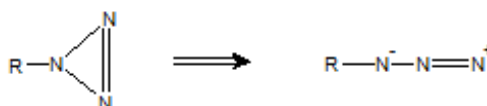
Zhášecí účinnost při statickém zhášení byla většinou v rozsahu 97-99,5%. V případě zhášení pomocí FRET azaftalocyaniny vykazovaly opět nejvyšší účinnost, což je dáno jejich širokým absorpčním spektrem a tedy výrazným překryvem s emisním spektrem fluoroforu.

Dále byly provedeny porovnávací studie účinnosti zhášení AzaPc a dalších DQ (BHQ1, BHQ2 a BBQ-650. AzaPc účinněji zhášely než oba BHQ a srovnatelně jako BBQ.^(1,22,23,24)

4 METODICKÁ ČÁST

4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti organických azidů

Nejprve podle Curtie a Hantzsche byl azid zobrazován jako cyklická struktura *1H*-triazirinu. Poté se přešlo k dnes užívané lineární formě azidu.⁽²⁵⁾



Obrázek 21: Vývoj zobrazování struktury azidu

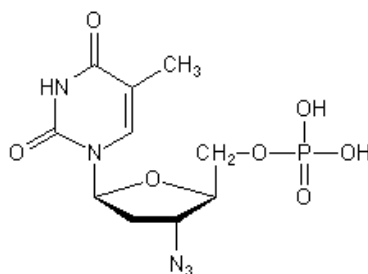
Azidy jsou také někdy označovány jako **pseudohalogeny**, protože některými svými vlastnostmi se právě halogenům podobají. Jsou měkkými nukleofily.

Vyskytují se v několika rezonančních strukturách, nejdůležitější je $\text{N}^- = \text{N}^+ = \text{N}^-$.

Organické azidy vykazují silnou absorpci v infračerveném spektru (2080 - 2170 cm^{-1}).

Výrazným rysem azidů je jejich toxicita. Například anorganický NaN_3 ($\text{LD}_{50} = 27 \text{ mg/kg}$) může být absorbován i kůží. Azidová skupina se přirozeně vůbec nevyskytuje v prostředí buňky, čehož se pak u některých reakcích využívá (viz. níže).

Azidy nachází četné uplatnění v organické chemii při syntéze různých heterocyklů obsahujících dusík, v chemii peptidů a podobně. Našli dokonce využití i jako léčiva. Azidonukleosidy se používají v léčbě AIDS, terminují totiž transkripci virové DNA.



Obrázek 22: AZT (3'-azido-2',3'-dideoxythymidin), používá se při terapii AIDS v kombinaci s dalšími léčivy, nevýhodou je ale jeho vysoká toxicita⁽²⁶⁾

Azidy rovněž hrají roli při přípravě terapeuticky významné struktury – **sartanů**. Někteří její zástupci jsou připravováni biosterickou náhradou karboxylové skupiny tetrazolovou.⁽²⁷⁾

Organoazidy jsou důležité složky v Huisgen 1,3-dipolární cykloadici - „click“ reakci. Jsou také využívány k přípravě biokonjugátů při Staudingerově reakci (viz. níže).

4.2 Příprava organických alifatických azidů

Hlavní zdroj azidové skupiny je **azid sodný**. Ten je vyráběn průmyslově reakcí oxidu dusného N_2O s amidem sodným za chlazení tekutým dusíkem:

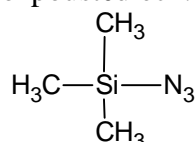


Většina organických i anorganických azidů jsou připravovány buď přímo, nebo nepřímo z azidu sodného. V následujícím textu jsou uvedeny některé způsoby přípravy azidů

4.2.1 Přenosem celé azidové skupiny na:

4.2.1.1 Alkeny

Alkeny, které tvoří stabilní karbokationty, poskytují reakce s azidovodíkovou kyselinou HN_3 . Ta je ovšem silně explozivní. Jako bezpečnější alternativa azidovodíkové kyseliny se používá na příklad trimethylsilylazid. Tento azid je rozpustný pouze ve vysoce polárních rozpouštědlech.⁽²⁷⁾



Obrázek 23: Struktura alternativního azidačního činidla trimethylsilylazidu

Kobaltem katalyzovaná azidace alkenů

Jedná se o vysoce selektivní konverzi různých alkenů na azidy, dle Markovnikova pravidla. Vyšších výtěžků bylo dosaženo použitím katalýzy kobaltnatými ionty, 3 ekvivalentů *p*-toluensulfonylazidu (tosylazidu) jako zdroje dusíku a jednoduchých silanů – fenylsilanu (PhSiH_3) nebo tetramethylidisiloxanu (TMDSO).

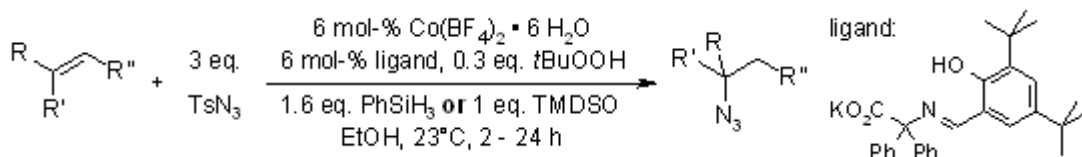


Schéma 5: Průběh kobaltem katalyzovaného vzniku alkyl azidů z alkenů (28)

Tuto reakci lze aplikovat na mono-, di- i tri- substituované alkeny. Reagují dobře různé funkční skupiny, jako estery a silyletherové skupiny. Získané alkyl azidy mohou být bezprostředně po vzniku konvertovány na aminy (redukcí) nebo triazoly (Cu(I)-katalyzovanou cykloadicí)

Kobaltem katalyzovaná syntéza terciárních azidů z α,α -disubstituovaných alkenů

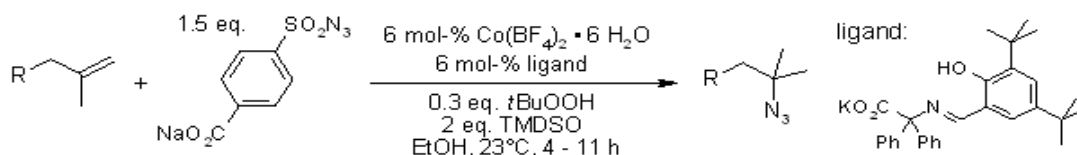


Schéma 6: Průběh kobaltem katalyzovaného vzniku alkyl azidů, jako donor azidové skupiny je použit azidosulfonylbenzoát sodný (29)

Syntéza poskytuje terciární azidy v dobrých výtěžcích za mírných podmínek.

Regiospecifická azidojodace alkenů jodistanem sodným, jodidem draselným a azidem sodným

Kombinace těchto tří sloučeniny je účinný, jednoduchý a levný způsob pro získání azidojodovaných alkanů. Regiospecifická 1,2-azidojodace poskytuje β -jodazidy v relativně vysokých výtěžcích.

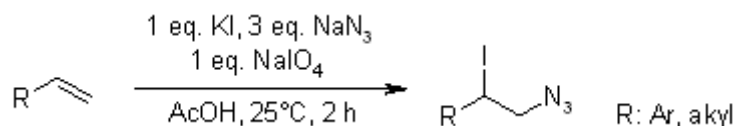
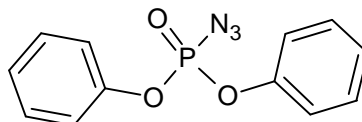


Schéma 7: Syntéza β -jodazidu z alkenů (30)

4.2.1.2 Alkoholy

Alifatické **primární a sekundární alkoholy** poskytují azidy díky tzv. Mitsunobuově reakci za použití azidovodíkové kyseliny HN_3 , trifenylofosfinu a diethylazodikarboxylátu (DEAD). Konverze $-\text{OH}$ skupiny na azid se ale v tomto případě neprovádí z důvodu přípravy azidu samotného. Důležitější je následná přeměna azidu v další funkční skupiny. Opět vysoce explozivní azidovodíková kyselina může být nahrazena difenylfosforyl azidem (DPPA).^(27,31)



Obrázek. 24: Struktura difenylfosforyl azidu (DPPA)

Terciární alkoholy mohou také poskytovat azidy. Při této substituci vzniká příslušný karbokation, který je substituován azidovou skupinou a následně vzniklé azidy mohou být přeměněny na iminy.

Přímá syntéza organických azidů z alkoholů za použití 2-azido-1,3-dimethylimidazolium hexafluorophosfátu

Přenos azidu z 2-azido-1,3-dimethylimidazolium hexafluorofosfátu (ADMP) na alkohol poskytuje adekvátní azidy při mírných reakčních podmínkách. Azidy je pak možné jednoduše izolovat, protože vedlejší produkty jsou velmi dobře rozpustné ve vodě.

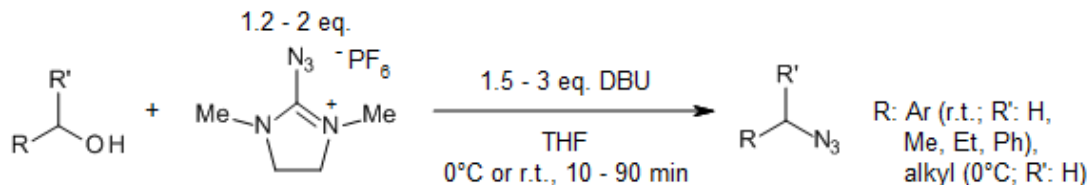


Schéma 8: Vznik alkyl azidů z alkoholů ⁽³²⁾

4.2.1.3 Halogeny

Nukleofilní substituce alkylhalogenů s azidem sodným ve vodných roztocích poskytují příslušné alkylazidy. Analogicky je tomu při reakci acyl halogenů s azidovým iontem.

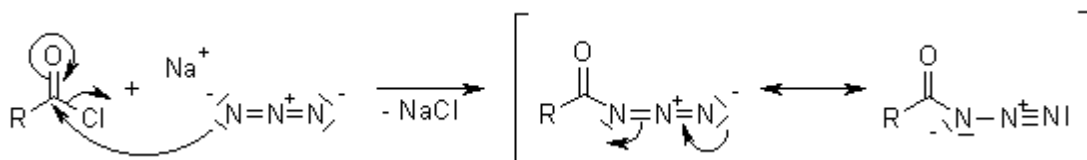


Schéma 9: Vznik acyl azidu z acyl halogenu substitucí azidového iontu ⁽³³⁾

α -chlormethyl ester a α -chlor alkohol jsou také přeměňovány na odpovídající azidy za přítomnosti NaN_3 v DMF při 60°C .

V případě dibrom esteru a mírném nadbytku azidu sodného v DMF vzniká monoazid ve vysokém výtěžku a asi 15% diazidu.

Kool a kol. popsali konverzi 5'-jod oligonukleotidů na 5'-azido oligonukleotidy díky náhradě halogenu s pomocí NaN_3 v DMF.

Substituce alkyl halogenů azidovou skupinou na pevné fázi může být prováděna buď pomocí NaN_3 nebo tetrabutylamonium azidu. ⁽²⁷⁾

4.2.1.4 Deriváty sulfonových kyselin

Velmi často se používá přeměna funkční skupiny nejprve na lépe odstupující, např. methansulfonylovou skupinu a ta následně reaguje s azidem sodným, za vzniku adekvátních azidů.

Tato strategie se používá při přípravě azidovaných sacharidů, které jsou důležité hlavně z hlediska možnosti jejich redukce a získání amino-cukrů.

Tento přístup byl použit i v této diplomové práci k získání některých struktur, včetně cílové.

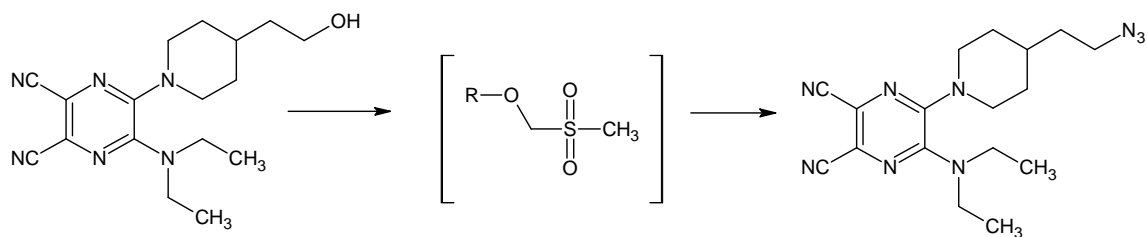


Schéma 10: Příprava 5-[4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl]-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3) z 5-diethylamino-6-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2) pomocí mesylace

4.2.2 Přenos diazo-skupiny na aminy

Využití diazotransferu je dalším způsobem přípravy organoazidů. Imidazol-1-sulfonylazid hydrochlorid se v níže uvedené reakci používá jako diazotransferové činidlo. Je to krystalická, skladovatelná pevná látka. V reakci primárních alkyl a aryl aminů funguje jako donor diazo-skupiny, za vzniku odpovídajících azidů.

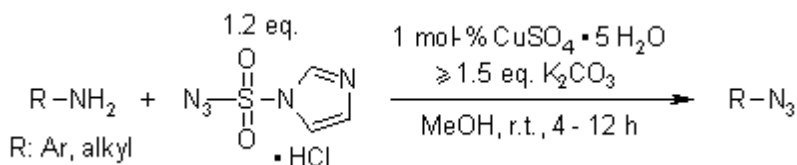


Schéma 11: Příprava organoazidu za použití diazotransferového činidla (34)

Další způsob přípravy organoazidů může probíhat **rozštěpením** složitějších, často cyklických struktur, obsahujících potřebnou řadu dusíků. Příkladem může být rozštěpení epoxidového kruhu vlivem azidového iontu. Tato reakce poskytuje α -azidoalkoholy. Organoazidy se mohou také připravovat **přesmykem z jiných azidů**.^(35,27)

4.3 Důležité reakce organoazidů

4.3.1 Cu(I)-katalyzovaná Huisgenova cykloadice („click“ reakce)

„Click“ reakce poskytují produkty rychle, spolehlivě a v dobrých výtěžcích, za mírných reakčních podmínek.

V reakci se uplatňuje měďný kation jako katalyzátor.⁽³⁶⁾

Mechanismus click reakce

Jedná se o reakci **azidů a alkyňů** za laboratorní teploty.

Cu(I) tvoří *in situ* π -komplex s trojnou vazbou terminálního alkyneu. V přítomnosti báze se odtrhává terminální vodík za vytvoření meziprojektu **Cu-acetylidu**. Další Cu(I) mezitím aktivuje azid. Dochází pak k tvorbě **Cu-azid-acetylidového komplexu**. V této chvíli může začít proces cyklizace.

Produktem cyklizace je kruh obsahující **triazolové seskupení**.

Co se týče tvorby katalyzátoru, osvědčilo se použití směsi Cu(II) nebo CuSO₄ a redukčního činidla (askorbát sodný aj.) k získání Cu(I) *in situ*. Cu(I) je rovněž možno stabilizovat ligandy jako např. tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA), pro lepší výnosnost reakce.⁽³⁷⁾

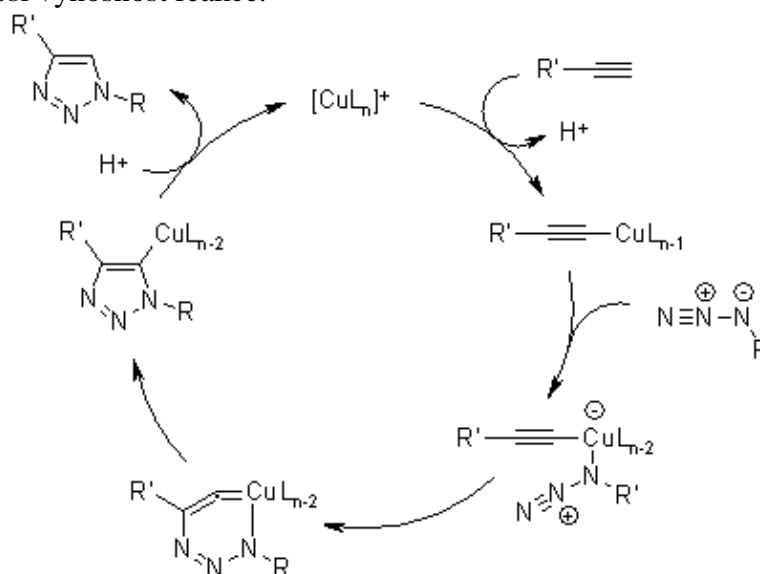


Schéma 12: Popis průběhu Cu(I)-katalyzované cykloadice⁽³⁸⁾

Reakce může probíhat v různých rozpouštědlech, jako jsou alkoholy, DMSO, DMF nebo butanol a aceton. Acetonitril není vhodný kvůli nežádoucím reakcím s Cu(I).

Reakce di-azidů a di-alkynů s Cu(I) a TBTA vede k vzniku konjugovaných fluorenpolymerů. Stupeň polymerizace může dosahovat až 50.

Ani alkyne ani azidy se nevyskytují přirozeně v buňce, reagují tedy v biologických médiích jen spolu, chemoselektivně.

Praktické využití spočívá v umožnění sledování enzymové aktivity, vizualizace biomolekul ve fixovaných buňkách, detekce DNA syntézy v proliferujících buňkách a selektivní připojení fluoroforové značky k virovým strukturám. Přítomnost Cu(I) v některých buňkách je nežádoucí, kvůli toxicitě. Což představuje určitý limit pro použití této reakce.^(37,38,39)

V této práci bylo zamýšleno pomocí „click“ reakce umístit cílovou molekulu AzaPc, zášee fluorescence, na oligonukleotid značený na terminálním konci alkyne a umožnit tak následný vznik hybridizační fluorescenční sondy.

4.3.2 Staudingerova reakce (crosslinking, biokonjugace)

Tato reakce byla objevena laureátem Nobelovy ceny (1953) Hermannem Staudingerem, v roce 2000 (Saxon a Bertozzi) byla aplikována na biologické systémy a biokonjugační technologie.

Je to opět chemoselektivní metoda, spočívá v reakci **azidů s methylester fosfinem**.

Jak už bylo řečeno azidy a ani fosfiny nejsou součástí živé buňky, v jejím prostředí reagují tedy pouze spolu. Dochází v podstatě k detekci azidové značky pomocí fosfinových sloučenin.

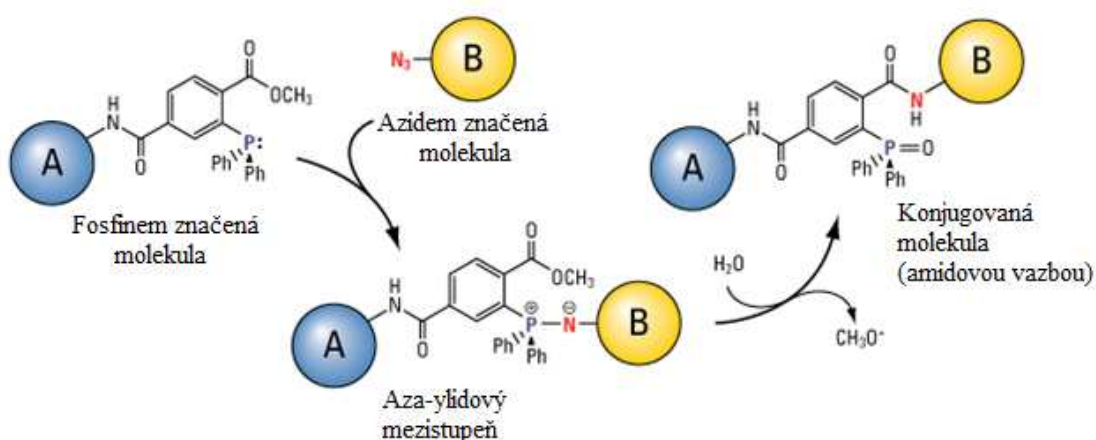


Schéma 13: Detekce azidové značky fosfinem, za vzniku konjugátu, který obsahuje amidovou vazbu ⁽³⁹⁾

Azidová skupina je relativně malá, tudíž mohou být syntetizovány biogenní molekuly, které budou azid obsahovat ve své struktuře, například aminokyseliny, sacharidy a další základní stavební kameny pro metabolismus značené tímto způsobem. Tyto pozměněné molekuly jsou pak vpraveny do buňky, aby se začlenily do metabolismu. Pak se do organismu vpraví fosfinem značená látka. V organismu se tyto sloučeniny setkají a konjugují navzájem s vysokou specifitou.

Tato biokonjugační reakce je šetrnější než výše zmíněná azid-alkyn „click“ reakce, jelikož nevyžaduje přítomnost měďného kationtu. Proto je tedy Staudingerova reakce velmi dobře využitelná pro sledování mechanismů v živých buňkách. ⁽³⁹⁾

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Všechna použitá organická rozpouštědla byla analytické kvality. Bezvodý butanol byl skladován nad hořčíkem a destilován těsně před vlastním použitím. Všechny chemikálie, použité během jednotlivých syntéz, byly zakoupeny od uznávaných dodavatelů (Aldrich, Acros, Merck, TCI Europe) a použity bez dalšího zpracování.

Tenkvrstvá chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách Merck se silikagelem 60 F₂₅₄. Pro sloupcovou chromatografii byl použit Merck Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm).

Infračervená spektra byla změřena na zařízení Nicolet 6700 v ATR modu.

¹H a ¹³C NMR spektra byla zaznamenána pomocí spektrometrů Varian Mercury Vx BB 300 nebo VNMR S500 NMR. Chemické posuny byly udávány relativně k tetramethylsilanu a vztaženy na signál rozpouštědla.

MALDI-TOF hmotnostní spektra byla zaznamenána v pozitivním reflektrotonovém módu na Voyager-DE STR hmotnostním spektrometru (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) v *trans*-2-[3-(4-*terc*-butylfenyl)-2-methyl-2-propenyliden]-malononitrilu, který byl použit jako matrice. Přístroj byl zevně kalibrován pomocí pětibodové kalibrace s využitím Peptide Calibration Mix 1 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France).

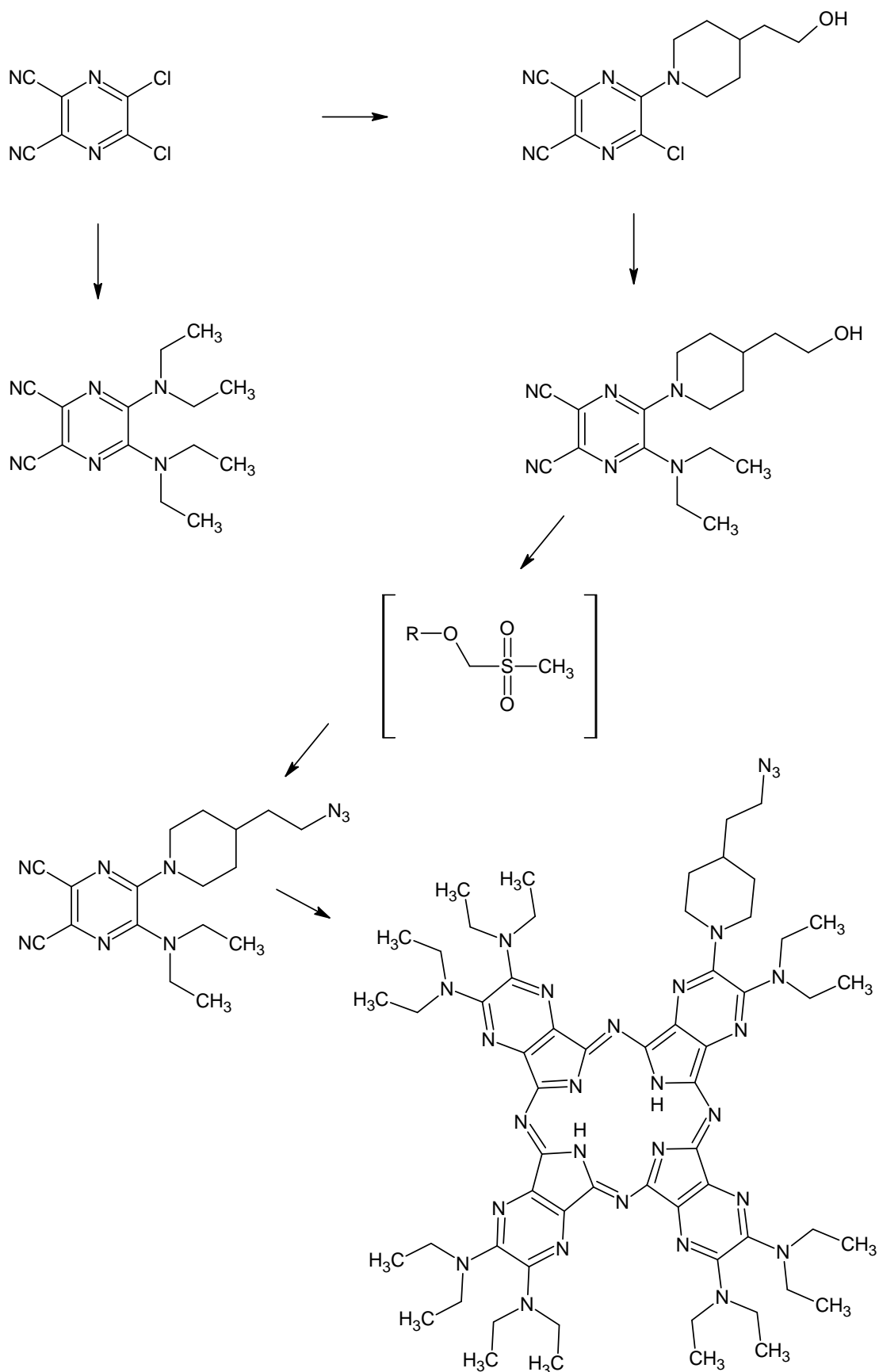
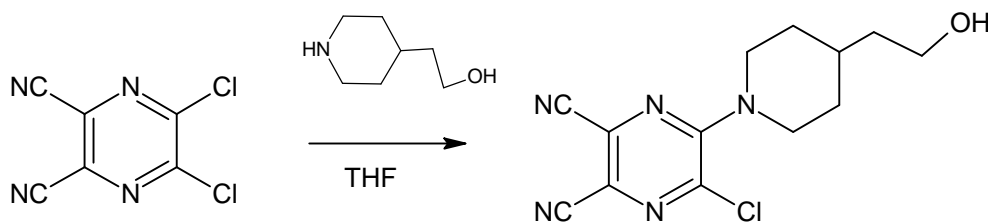


Schéma 14: Stručný přehled reakcí použitých k získání cílové struktury

5.1 Příprava 5-chlor-6-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1)



5 mmol 5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1,0 g) bylo rozpuštěno v cca 30 ml tetrahydrofuranu. Reakční směs byla ochlazena směsí ledu a soli. Poté bylo přidáno 10 mmol 4-hydroxyethylpiperidinu (1,29 g) rozpuštěného v tetrahydrofuranu. Reakční směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Reakce byla monitorována pomocí TLC (chloroform/aceton 50:1) oproti standardní látce. Po ukončení reakce bylo odpařeno rozpouštědlo. Směs byla vyčištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze chloroform/aceton 50:1). Požadovaná frakce byla zfiltrována a rozpouštědlo odpařeno. Výsledný produkt byl žlutý olej.

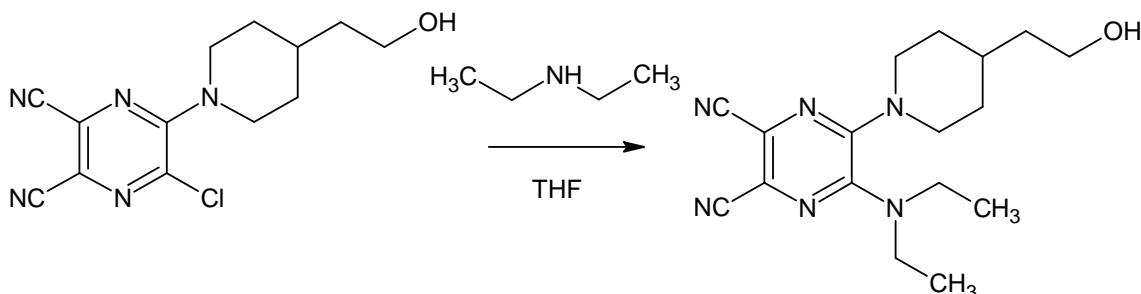
Výtěžek: 1,4 g, (90 % teoretického výtěžku)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 32,03; 32,12; 38,65; 48,76; 59,93; 112,80; 113,04; 118,74; 129,37; 137,70; 152,59.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4,53 (ddt, $J = 13,9; 4,7; 2,3$ Hz; 2H); 3,74 (t, $J = 6,4$ Hz; 2H); 3,10 (td, $J = 13,2; 2,4$ Hz; 2H); 1,99 – 1,80 (m, 3H); 1,67 (bs, 1H); 1,57 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H); 1,47 – 1,29 (m, 2H).

IR (ATR) ν_{max} : 3365; 2928; 2856; 2228; 1545; 1496; 1454; 1379; 1227; 1155; 1128; 1058; 978 cm^{-1} .

5.2 Příprava 5-diethylamino-6-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)



3 mmol 5-chlor-6-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1) (658 mg) a 9 mmol diethylaminu (1 ml) bylo rozpuštěno v THF. Soustava byla zahřívána 4 hodiny pod zpětným chladičem, při teplotě 90°C. Reakce byla monitorována pomocí TLC (chloroform/aceton 10:1) Po vychladnutí byla odfiltrována vzniklá sůl - diethylamonium hydrochlorid. Z reakční směsi bylo odpařeno rozpouštědlo.

Následovalo vyčištění pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (chloroform/aceton 8:1). Požadovaná frakce byla zfiltrována a odpařena. Vznikla olejovitá tekutina žluté barvy.

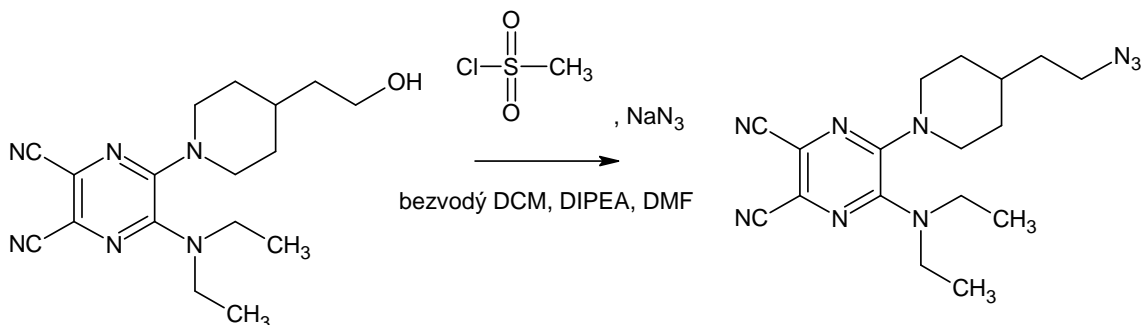
Výtěžek: 847 mg, (87 % teoretického výtěžku)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 12,76; 31,71; 32,43; 38,88; 42,36; 47,04; 60,07; 114,84; 114,91; 119,69; 121,04; 145,97; 146,75.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4,08 – 4,00 (m, 2H), 3,72 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,55 (d, $J = 7,1$ Hz, 4H), 2,80 – 2,70 (m, 2H), 1,83 (dd, $J = 14,4$; 3,4 Hz, 2H), 1,72 (ddd, $J = 11,2$; 7,4; 4,0 Hz, 1H), 1,54 (q, $J = 6,5$ Hz, 2H), 1,48 (bs, 1H), 1,32 – 1,20 (m, 2H), 1,10 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H).

IR (ATR) ν_{max} : 3405; 2973; 2931; 2874; 2227; 1712; 1518; 1487; 1449; 1436; 1373; 1270; 1227; 1091; 1060; 985 cm^{-1} .

5.3 Příprava 5-[4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl]-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)



2,5 mmol 5-diethylamino-6-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2) (0,8374 g) bylo rozpuštěno v bezvodém dichlormethanu, bylo přidáno 5 mmol diisopropylethylaminu (871 μl). Poté následoval přidavek 3,5 mmol methansulfonylchloridu (271 μl). Reakční směs byla míchána cca 1 hodinu. Reakce byla monitorována pomocí TLC (chloroform/aceton 20:1). Po dokončení mesylace byla soustava vytřepána s vodou, organická fáze byla vysušena síranem sodným a rozpouštědlo bylo oddestilováno za sníženého tlaku. Následně byl meziproduct rozpuštěn v bezvodém dimethylformamidu. Poté bylo přidáno 17,5 mmol azidu sodného (1,14 g). Směs byla zahřívána 1 hodinu při 100°C pod zpětným chladičem. Reakce byla monitorována pomocí TLC v chloroformu. Poté byla směs přečištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (chloroform).

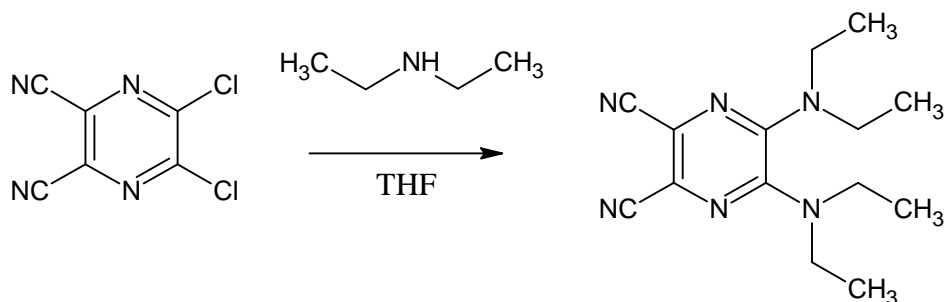
Výtěžek: 574 mg (65 % teoretického výtěžku)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 12,76; 31,38; 33,20; 34,95; 42,38; 46,89; 48,70; 114,78; 114,86; 119,71; 121,24; 146,03; 146,68.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4,05 (d, $J = 13,4$ Hz, 2H), 3,56 (q, $J = 7,1$ Hz, 4H), 3,5 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 2,75 (ddd, $J = 13,5$; 12,4; 2,5 Hz, 2H), 1,82 (d, $J = 14,2$ Hz, 2H), 1,55 – 1,53 (m, 3H + H_2O), 1,35 – 1,18 (m, 2H), 1,10 (t, $J = 7,0$ Hz, 6H).

IR (ATR) ν_{max} : 2970; 2935; 2226; 2102; 1523; 1515; 1483; 1452; 1435; 1373; 1357; 1347; 1264; 1250; 1227; 1062 cm^{-1} .

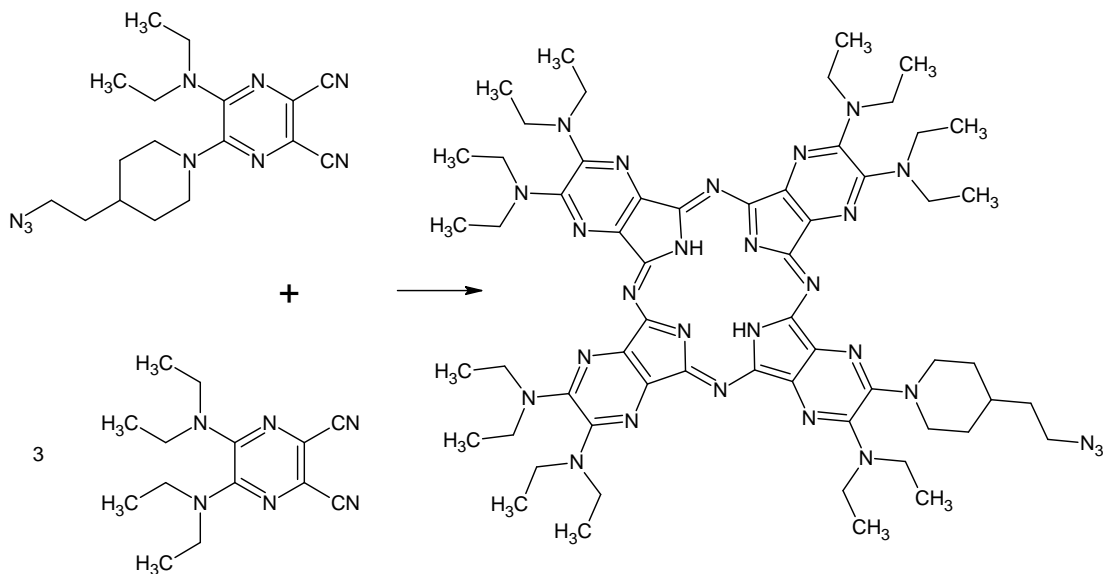
5.4 Příprava 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)



25,2 mmol 5,6-dichlor-2,3-dikarbonitrilu (5,012 g) bylo rozpuštěno v THF. Následně bylo přidáno 15 mmol diethylaminu (15,4 ml). Soustava byla umístěna pod zpětný chladič, zahřívána při 100°C po dobu 5 hodin. Pak byla ze směsi odsáta vzniklá sůl a bylo oddestilováno rozpouštědlo. Směs byla překrytalizována z methanolu. Látka má světle žluté, lesklé krystaly.

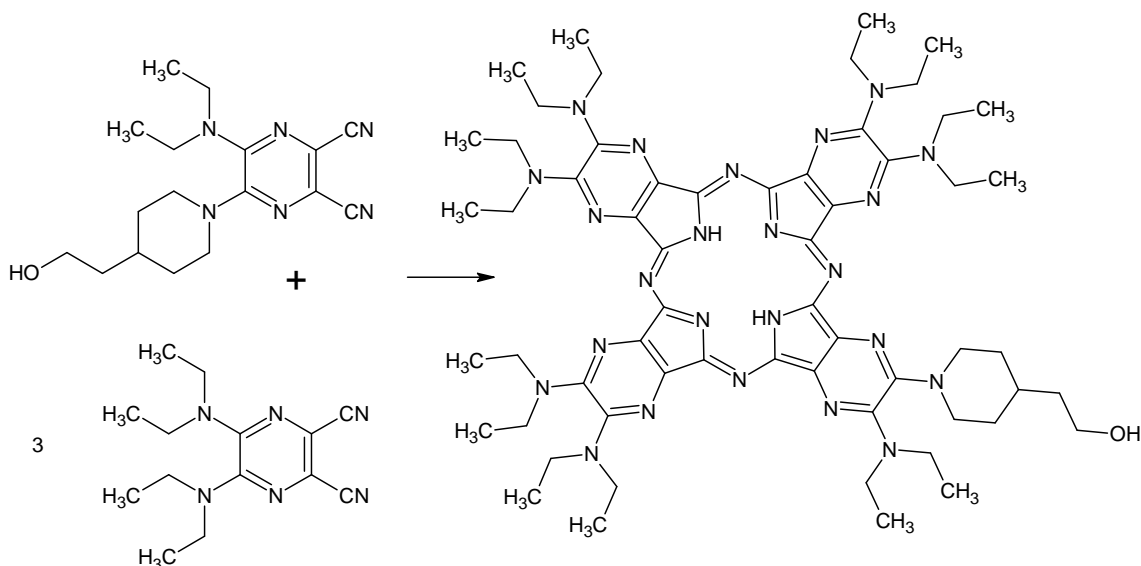
Výtěžek: 5,54 g, (81 % teoretického výtěžku)

5.5 Cyklizace 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4) a 5-[4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl]-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)



0,717 mmol pyrazindikarbonitrilu (3) (235 mg) a 2,2 mmol pyrazindikarbonitrilu (4) (585 mg) bylo rozpuštěno v bezvodém butanolu, zahříváno k varu, pod zpětným chladičem opatřeným sušící rourkou. Poté bylo přidáno 28 mmol kovového lithia (141 mg). Směs byla míchána a zahřívána po dobu tří hodin. Po skončení reakce bylo rozpouštědlo za sníženého tlaku oddestilováno a byla přidána 40 %-ní kyselina octová. Soustava byla míchána 30 minut za laboratorní teploty. Poté následovala filtrace, na filtru ulpívá tmavě fialová látka. Pevný podíl byl na filtru důkladně promyt vodou. Při hledání mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii bylo zjištěno, že jednotlivé kongenery měly stejné R_f a byly prakticky neoddělitelné.

5.6 Cyklizace 5-diethylamino-6-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2) s 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)



2,6 mmol pyrazindikarbonitrilu (2) (847 mg) a 7,8 mmol pyrazindikarbonitrilu (4) (2,1 g) bylo rozpuštěno v bezvodém butanolu, cca 20 ml. Směs byla umístěna pod zpětný chladič opatřený sušící rourkou a za míchání zahřívána k varu. Následoval přidavek 72,1 mmol kovového lithia, (504 mg). Udržovací teplota lázně pak činila 130°C a celková doba zahřívání byla 4 hodiny. Následovalo oddestilování rozpouštědla a přidavek 40 % kyseliny octové, soustava byla míchána 30 minut. Poté byla zfiltrována, promyta vodou. Směs byla vyčištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (směs dichlormethan/aceton/methanol 100:1:1). Po oddělení kongeneru nesoucího pouze diethylaminové substituenty byla soustava změněna (dichlormethan/aceton/methanol 20:1:1). Rozpoštědla byla oddestilována, produkt byl rozpuštěn v malém množství dichlormethanu a nakapán do benzínu. Následovala filtrace, po vyschnutí benzínu byl produkt smyt dichlormethanem a následně acetone. Poté byl produkt vysušen. Výtěžek: 437 mg, (15 % teoretického výtěžku)

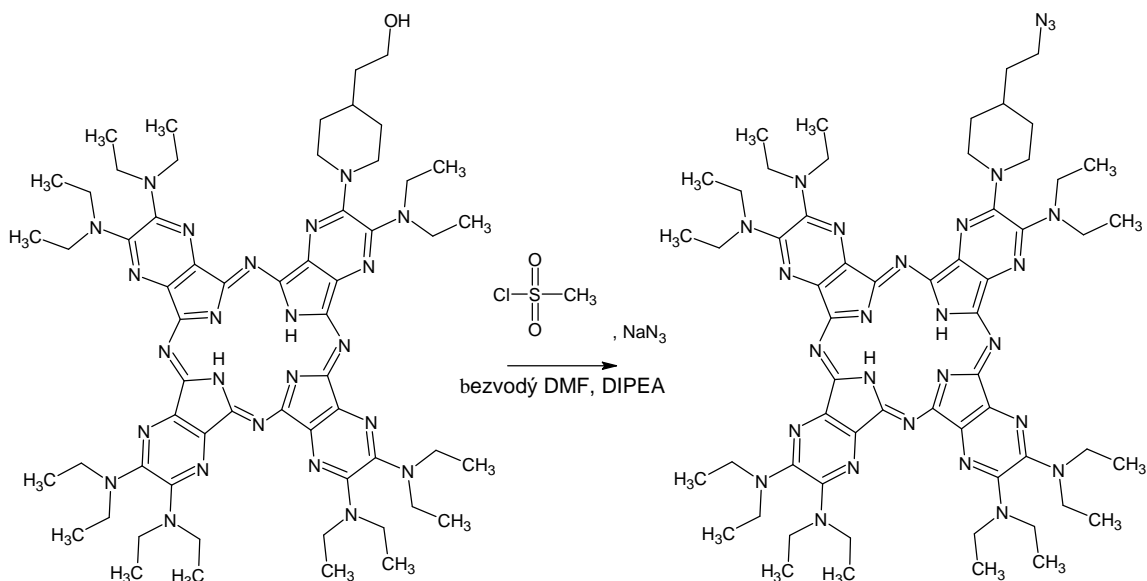
^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_6$) δ 12,51; 12,54; 31,88; 32,26; 39,13; 41,73; 41,94; 42,04; 47,17; 58,83; 123,11; 139,37; 139,43; 139,50; 139,87; 140,56; 146,00; 149,57; 149,60; 149,63; 149,65; 149,68; 150,67.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4,36 (d, $J = 12,7$ Hz, 2H), 3,77 (dq, $J = 30,9; 7,0$ Hz, 32H), 3,59 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,85 (t, $J = 12,1$ Hz, 2H), 1,85 – 1,70 (m, 2H), 1,62 (bs, 1H), 1,46 – 1,25 (m, 3H), 1,11 – 0,89 (m, 42H).

IR (ATR) ν_{max} : 3304; 2971; 2931; 2872; 1641; 1477; 1422; 1377; 1341; 1285; 1252; 1159; 1135; 1059; 1019; 756; 743; 691 cm^{-1} .

MALDI TOF (m/z): 1146,70 (vypočt. $[\text{M}]^+$ 1146,74)

5.7 Příprava 2-[4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (7)



0,2 mmol **(6)** (227 mg) rozpuštěno v bezvodém DMF, směs. Následoval přídavek 7,9 mmol diisopropylethylaminu (1,4 ml) a 7,9 mmol methansulfonylchloridu (611 μ l). Směs byla míchána přes noc, bez přístupu světla. Poté byl přidán 1mmol azidu sodného (63,9 mg). Směs byla zahřívána po dobu 1 hodiny při 100°C. Byla provedena kontrolní TLC (směs dichlormethan/aceton/methanol 100:1:1). Poté byla směs zahuštěna, promyta vodou a zfiltrována. K vyčištění směsi byla použita sloupcová chromatografie na silikagelu (směs dichlormethan/aceton/methanol 150:1:1). Směs mobilní fáze a produktu byla následně odpařena, produkt byl rozpuštěn v malém množství DMF a nakapán do benzínu. Směs byla umístěna do mrazáku. Vysrážený produkt byl zfiltrován a vysušen. Výtěžek: 179 mg

IR (ATR) ν_{max} : 3303; 2966; 2929; 2871; 2095; 1506; 1443; 1422; 1376; 1341; 1285; 1251; 1160; 1131; 1058; 1017; 748; 693 cm^{-1} .

MALDI TOF (m/z): 1171,67 (vypočt. $[M]^+$ 1171,75).

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

AzaPc jsou získávány cyklotetramerizací vhodně substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů. Nejprve byly syntetizovány vhodné prekurzory pro následnou přípravu cílové struktury, která obsahovala jednu azidovou skupinou. Ta je totiž důležitá pro vazbu AzaPc na 5'-konec oligonukleotidu modifikovaném terminálním alkynem, pomocí cykloadiční reakce – „click“ reakce.

Jako výchozí skelet byl zvolen pyrazin-2,3-dikarbonitril, jelikož právě nitrilové skupiny se účastní tvorby centrálních pyrrolových jader a vazeb mezi jednotlivými čtvrtinami makrocycyku AzaPc.

Pokud jsou požadovány na AzaPc skeletu periferní substituenty vázané přes heteroatom (v případě této práce dusík), provádí se nukleofilní substituce 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu přebytkem nukleofilního činidla. Vznikají pak látky se stejnými substituenty v poloze 5 a 6.

Pokud je vyžadována syntéza prekurzorů monosubstituovaných, provádí se nukleofilní substituce se dvěma ekvivalenty nukleofilu, za snížené reakční teploty. Tyto sloučeniny pak mohou dále podléhat reakci s jiným nukleofilem a získávají se tak prekurzory, které mají dva různé periferní substituenty.⁽¹⁾

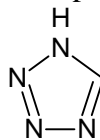
Při syntéze pyrazindikarbonitrilu (**1**) bylo na základní strukturu umístěno hydroxyethylpiperidinové jádro do polohy 6. Tato reakce probíhala za snížené teploty, aby docházelo k substituci pouze jednoho vazebného místa. Výtěžky produktu byly vysoké. Poté byla získaná látka podrobena reakci s diethylaminem a vznikl tak skelet pyrazindikarbonitrilu (**2**) se dvěma různými substituenty na pozici 5 a 6 opět ve vysokém výtěžku.

U prekurzoru (**4**) byly do pozice 5 i 6 pyrazin-2,3-dikarbonitrilu umístěny diethylaminové zbytky. Reakce probíhala v nadbytku činidla, aby došlo k substituci na obou místech.

Substituce dialkylaminovými zbytky hraje důležitou roli v ovlivnění fotofyzikálních a fotochemických vlastností AzaPc. Po cyklotetramerizaci prekurzorů s těmito substituenty se volný elektronový pár dusíkového atomu zapojí do konjugace, a když dojde k excitaci molekuly, velmi rychle se přerozděluje hustota náboje v molekule a dochází pak k rychlému návratu do základního stavu (intramolekulární přenos náboje). Nedojde tedy k emisi fluorescence ani k emisi $^1\text{O}_2$. V případě, že je těchto substituentů na periférii více, látka ztrácí úplně schopnost emitovat fotony. Již jedno donorové centrum v molekule vyvolává intramolekulární přenos náboje.⁽¹⁾

Syntéza 5-[4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl]-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**3**) byla nejprve prováděna bez vytřepání soustavy ve vodě, před přidáním azidu sodného. Při analýze NMR spekter takto získaného produktu bylo zjištěno, že se v molekule sice azidová skupina nachází, ale výtěžek celkové reakce byl velmi malý (36%) a špatně reprodukovatelný.

Vysvětlení malého výtěžku spočívá zřejmě v tom, že po přidání azidu sodného k pyrazindikarbonitrilu v přítomnosti amoniových solí, v tomto případě diisopropylethylamonium hydrochloridu, pravděpodobně vzniká z nitrilové skupiny pyrazinu a azidu sodného tetrazol. To vede ke snížení počtu použitelných molekul pro cyklotetramerizaci a tedy k nízkým výtěžkům požadované struktury. Rovněž se produkt stává nepoužitelný pro cyklotetramerizační reakce, protože nitrilové skupiny se účastní tvorby centrálních pyrrolových jader a v tomto případě tvoří tetrazol.



Obrázek 25: Struktura tetrazolu

Při použití konvenčních metod přípravy vzniká tetrazol z neaktivovaných nitrilů neochotně a při vysokých reakčních teplotách. Avšak při katalýze amoniovými solemi na pyrazindikarbonitrilech se tvoří snadno a při relativně mírných reakčních podmínkách (teplota 100°C).

Následovala tedy optimalizace reakčního postupu, spočívající v odstranění diisopropylethylamoniových solí vytřepáním s vodou. Mesylát ve vodě nepodléhá rozkladu, jedná se tedy o nejjednodušší způsob zbavení se nežádoucích solí. A až poté byl přidán azid sodný.

Výtěžky reakce se po optimalizaci zhruba zdvojnásobily a v IČ spektru produktu se již nacházel absorpční pás odpovídající azidové skupině s vlnočtem 2102cm⁻¹ (pro azidovou skupinu je rozmezí 2080 až 2170 cm⁻¹).⁽⁴⁰⁾

AzaPc makrocyclus vzniká reakcí čtyř molekul pyrazindikarbonitrilu. K jejich cyklotetramerizaci může docházet dvěma základními mechanismy. První spočívá v tzv. templátovém efektu kationtu kovu, prekurzory se seskupí okolo něj a následným zahřátím reakce dojde k vytvoření jádra. Kationt se pak stává součástí makrocyclu.

Nejčastější způsob získání AzaPc spočívá v ataku alkoholátu alifatického alkoholu na elektron deficitní uhlík nitrilové skupiny. Vzniká mezistupeň, alkylkarboximidát, ten dále napadá další nitrilové skupiny, až dojde ke vzniku AzaPc.⁽¹⁾

V cyklotetramerizaci AzaPc (**6**) i (**7**) byl využit atak butanolátu lithného.

Při volbě strategie přípravy AzaPc (**7**) byly jako prekurzory nejprve zvoleny 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**4**) a 5-[4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl]-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**3**). Toto se jevílo jako nejjednodušší cesta k získání požadovaného azaftalocyaninu.

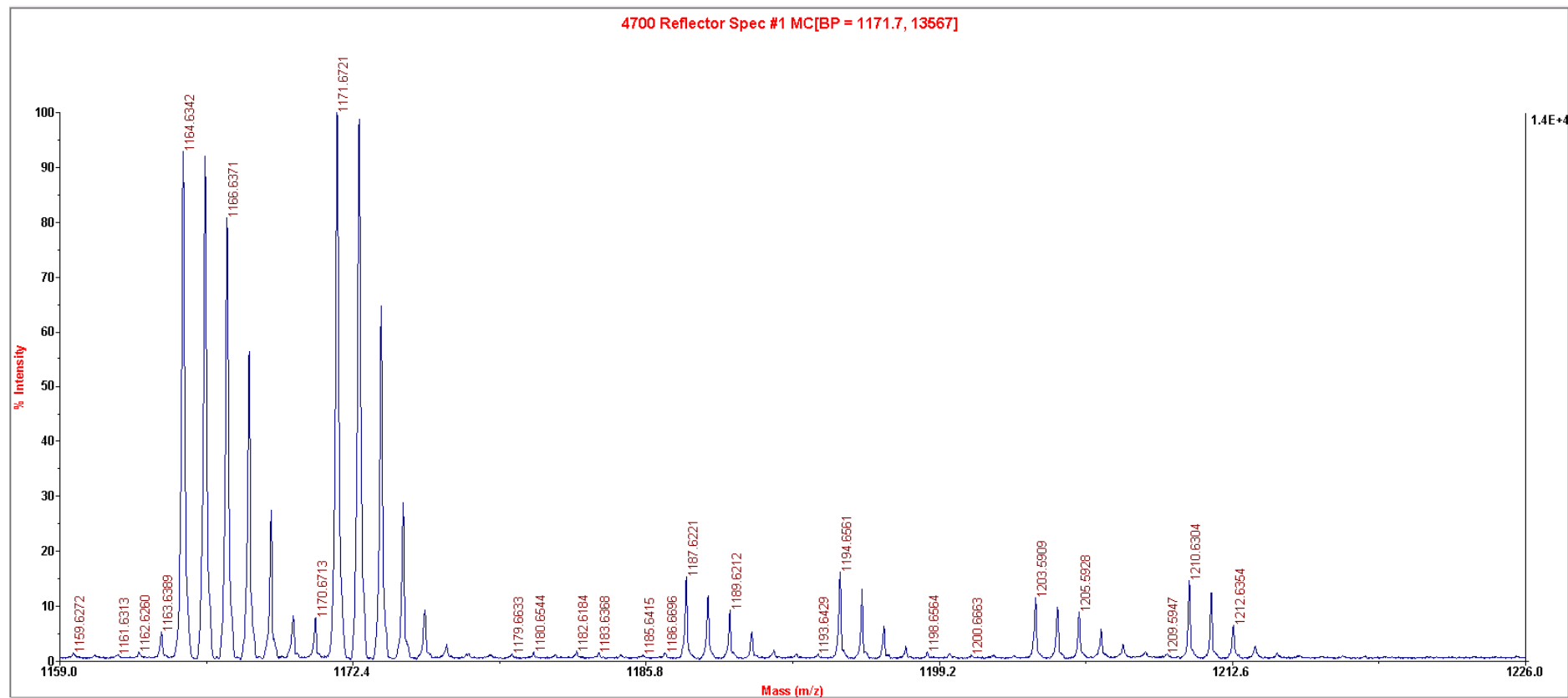
Po provedení cyklotetramerizace při hledání vhodné mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii bylo zjištěno, že jednotlivé kongenery mají prakticky stejný retenční faktor (R_f). Vhodnou soustavu k jejich oddělení se nepodařilo najít.

Na základě tohoto zjištění byla zvolena strategie nejprve cyklotetramerizovat 5-diethylamino-6-[4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl]pyrazin-2,3-dikarbonitril (**2**) a 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**4**). Vzniklý cyklus AzaPc(**6**) neobsahuje požadovanou azidovou skupinu, ale hydroxylovou skupinu, je tedy potřeba provést modifikaci na připraveném AzaPc.

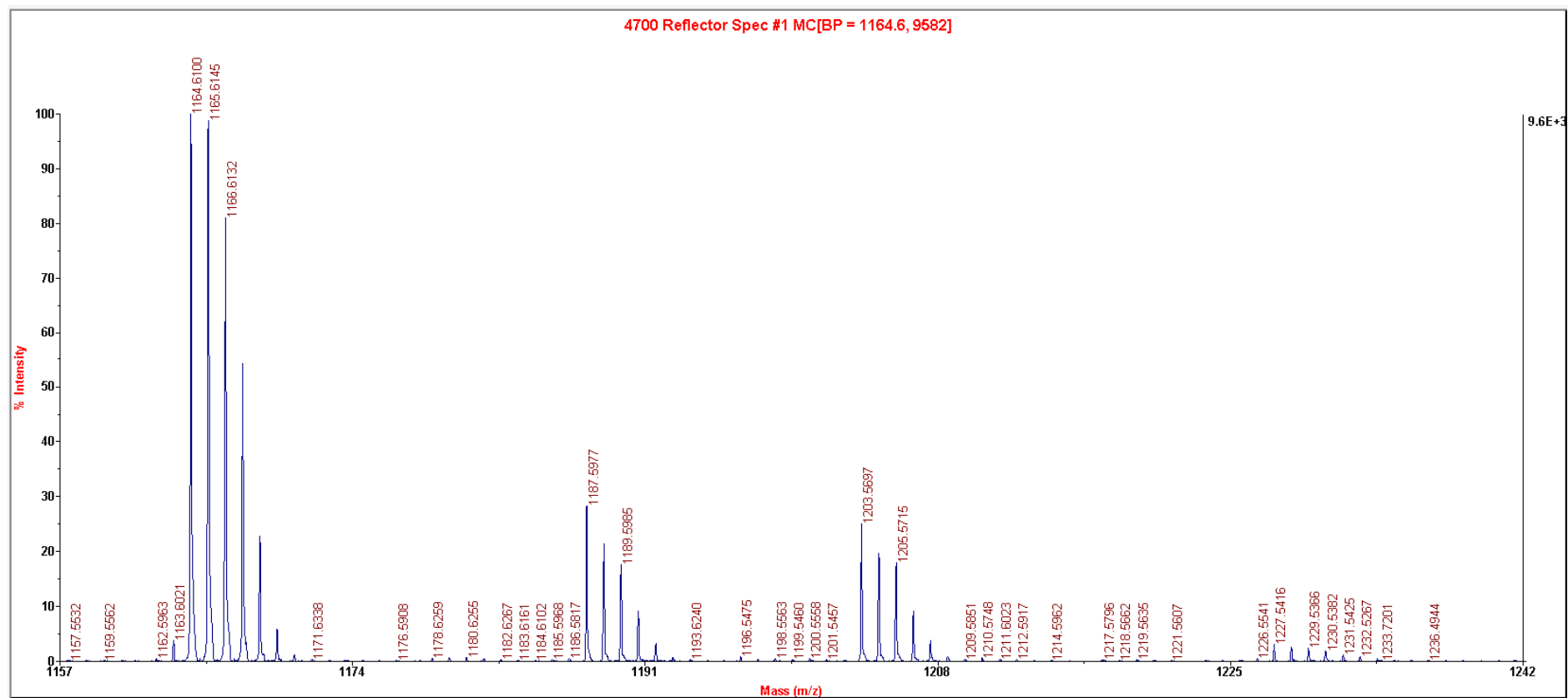
Cyklotetramerizace AzaPc (**6**) využívá ataku butanolátu lithného. Výtěžek požadovaného kongeneru byl 15%, což je poměrně vysoký výtěžek, protože při tomto způsobu přípravy vzniká směs různých kongenerů. První pokus přípravy AzaPc (**7**) vycházel z velmi malého množství (desítky miligramů) AzaPc (**6**). Výsledný produkt byl podroben spektrálními analýzám - MS spektra a rovněž IČ spektra a ty potvrdily totožnost struktury a přítomnost azidové skupiny. Produkt ale nebyl zcela čistý.

Když byla reakce k získání AzaPc (**7**) provedena ve větším množství, požadovaný produkt se nepodařilo získat. Hmotnostní spektrum ukazuje cluster s hmotností o 7 jednotek nižší. Což by odpovídalo absenci dusíku (viz Obr. X a X). IČ analýza rovněž nepotvrdila přítomnost azidové skupiny. Výsledný produkt vzniklý při reakci s větším množstvím prekurzorů se nepodařilo identifikovat.

Cyklotetramerizace AzaPc (**7**), tedy cílové struktury se podařila provést ve velmi malém množství a výsledný produkt neměl dostatečnou čistotu. Při zvětšení reakčních množství požadovaný AzaPc nevznikal pravděpodobně vůbec.



Obrázek 26: Hmotnostní spektrální analýza AzaPc (7), reakce v malém množství – cluster v pozici 1171,4



Obrázek 27: Hmotnostní spektrální analýza AzaPc (7), reakce ve větším množství – cluster v pozici 1164,6, tedy o 7 menší než u analýzy látky připravené v menším množství

7 ZÁVĚR

Byly připraveny vhodné prekurzory pro syntézu cílového azaftalocyaninu. Z nich byl připraven a popsán azaftalocyanin nesoucí jednu hydroxylovou skupinu. Při přípravě cílové struktury azaftalocyaninu obsahující azidovou skupinu se produkt nepodařilo připravit v dostatečném množství a čistotě.

8 LITERATURA

1. **Zimčík, Petr.** Azaftalocyaniny - od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím. *Chem. Listy*. 106, **2012**, 275-282.
2. Lékařská fakulta UK. *psych.lf1.cuni.cz* [Citace: 15. duben 2013.] <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>.
3. **Fišar, Zdeněk.** Fluorescenční spektroskopie v neurověděch. *psych.lf1.cuni.cz*. [Citace: 27. únor 2013.] <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>.
4. **Marras, Salvatore A. E.** Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes. [autor knihy] Didenko V.V. *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes : Designs and Protocols*. Totowa : Humana Press Inc., **2006**.
5. **Biosearch Technologies, Inc.** [Citace: 14. duben 2013.] <https://www.biosearchtech.com/display.aspx?catid=226,234&pageid=226>
6. **Hof, Martin a Macháň, Radek.** *Quenching of fluorescence*. [dokument pps] Praha : ČVUT, fakulta biomedicínského inženýrství.
7. **Hofr, Ctirad.** *is.muni.cz. Nevlastní fluorescence-fluorescenční značky, sondy a indikátory. 2007.* [Citace: 27. únor 2013.] http://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi7230/um/3973768/10_NevlastniF.pdf.
8. **Le Reste, Ludovic, a další.** Characterization of Dark Quencher Chromophores as Nonfluorescent Acceptors for Single-Molecule FRET. *Biophysical Journal*. 102, **2012**, Sv. 11, 2658-2668.
9. sigma-aldrich. [Citace: 26. březen 2013.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/502219?lang=en®ion=CZ>.
10. sigma-aldrich. [Citace: 26. březen 2013.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d9689?lang=en®ion=CZ>.
11. **Kool, Eric T. a Crisalli, Pete.** Multiple Pathway Quenchers: Efficient Quenching of Common Fluorophores. *Bioconjug Chem.* 22, **2011**, Sv. 11, 2345-2354.
12. **Biosearch Technologies, Inc.** Patent Dark quenchers for donor-acceptor energy transfer. *google*. **2011**. [Citace: 26.. březen 2013.] <http://www.google.com/patents/EP2333113A1?cl=en>
13. atdbio. [Citace: 24. duben 2013.] <http://www.atdbio.com/content/35/FRET-fluorescence-quenchers>
14. **Moreira, Bernardo G., a další.** Effects of fluorescent dyes, quenchers, and dangling ends on DNA duplex stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 327, **2005**, Sv. 2, Pages 473–484.
15. **Peng, X., Chen, H. a Draney, Daniel R.** A Non-fluorescent, Broad Range Quencher Dye for FRET Assays. *Analytical Biochemistry*. 388, **2009**, 220-228.
16. Patent Fluorescence quencher molecules. *google*. [Citace: 9. květen 2013.] <http://www.google.com/patents/US8350038>
17. **Moreira, Bernardo G., a další.** Effects of fluorescent dyes, quenchers, and dangling ends on DNA duplex stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 327, **2005**, Sv. 2, Pages 473–484
18. G-Biosciences. [Citace: 11. květen 2013.] <http://www.gbiosciences.com/HOOKDyeLabelingTAMRA-desc.aspx>.
19. **Kondo, Masaharu, Mehiri, Mohamed a Regen, Steven L.** Viewing Membrane-Bound Molecular Umbrellas by Parallax Analyses. *J. Am. Chem. Soc.* 130, **2008**, Sv. (41), 13771–13777.
20. **Sahoo, Daisy, a další.** Fluorescence Studies of Exchangeable Apolipoprotein-Lipid Interactions. *J. of bio. chemistry*. 273, **1998**, 1403-1408.
21. **Huang, Lingyan, a další.** Fluorescence Quenching by Proximal G-bases. *Integrated DNA Technologies*. **2005**.
22. **Kopecký, Kamil, a další.** Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedon*. 67, **2011**, Sv. 33, 5956-5963.

23. **Kopecký, Kamil a kol.** Solid-phase synthesis of azaphthalocyanine-oligonucleotide conjugates and their evaluation as new dark quencher of fluorescence. *Bioconjugate chemistry*. 21, **2010**, Sv. 10, 1872-1879.
24. **Kopecký, Kamil, a další.** Synthesis and Properties of Azaphthalocyanines. *Macroheterocycles*. 4, **2011**, Sv. 3, 171-176.
25. **Bräse, stefan, a další.** Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds. *Angew. Chem. Int.* 44, **2005**, 5188-5240.
26. **Kopecký, Vladimír.** *Studium strukturních a fyzikálně-chemických vlastností nových acyklických analogů nukleotidů - potencialních terminatorů virové DNA transkripce.* Praha : Fyzikální ústav MFF Univerzita Karlova, **1998**.
27. **Wiley, John & Sons.** *Organic azides: Syntheses and applications.* **2010**. ISBN: 978-0-470-51998-1.
28. **Waser, J., Nabu, H. a Carreira, E. M.** Cobalt-Catalyzed Hydroazidation of Olefins: Convenient Access to Alkyl Azides. *Am. Chem. Soc.* 127, **2005**, Sv. (23), 8294–8295.
29. **Gaspar, B., Waser, J. a Carreira, E. M.** Cobalt-Catalyzed Synthesis of Tertiary Azides from α,α -Disubstituted Olefins under Mild Conditions Using Commercially Available Reagents. *Synthesis*. (24), **2007**, 3839-3845.
30. **Chouthaiwale, P. V., a další.** Regiospecific Azidoiodination of Alkenes with Sodium Periodate, Potassium Iodide, and Sodium Azide: A High-Yield Synthesis of β -Iodoazides. *Synthesis*. (22), **2010**, 3879-3882 .
31. Organic chemistry portal - mitsunobu. [Citace: 2. květen 2013.] <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/mitsunobu-reaction.shtm>.
32. **Kitamura, M., a další.** Direct Synthesis of Organic Azides from Alcohols Using 2-Azido-1,3-dimethylimidazolium Hexafluorophosphate. *Synlett*. 23, **2012**, Sv. (9), 1335-1338.
33. Organic chemistry portal. [Citace: 5. květen 2013.] <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/curtius-rearrangement.shtm>.
34. **Stick, R. V. a Goddard-Borger, E. D.** An Efficient, Inexpensive and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. *Organic Lett.* 9, **2007**, Sv. (19), 3797–3800
35. **Bräse, stefan, a další.** Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds. *Angew. Chem. Int.* 44, **2005**, 5188-5240.
36. **Hradilová, Ludmila.** *Syntéza a biologické vlastnosti heterocyklických sloučenin, disertační práce .* Olomouc : Univerzita Palackého, **2012**.
37. Click chemistry reagents, product and ordering. *Jena bioscience*. [Citace: 10. květen 2013.] <http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/1379/?gclid=CKDpzPzhjbcCFQ1f3godABAA9Q>.
38. **Himo, Fahmi, a další.** Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *Am. Chem. Soc.* 127, **2005**, 210-216.
39. Thermo scientific. [Citace: 4. květen 2013.] <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4DEE3493-5056-8A76-4E33-8F3C0C374DE8>.
40. **Bouzek, Petr. 2006.** [Citace: 8. květen 2013.] is.muni.cz/th/40765/prif_m/Petr_Bouzek_diplomova_prace_2006.txt.

