

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



**Studium azaftalocyaninů jako zhášeců fluorescence  
v oligodeoxynukleotidových sondách**

Disertační práce



**Mgr. Jiří Demuth**

Vedoucí disertační práce:

Odborný konzultant:

Hradec Králové 2020

doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.



*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením svého školitele a konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

V Hradci Králové, květen 2020

.....  
Mgr. Jiří Demuth



Na tomto místě bych rád poděkovat zejména svým školitelům doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. a prof. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D., kteří se starali o mé odborné vedení během mého postgraduálního studia.

Samozřejmě velký dík patří i dalším členům naší výzkumné skupiny AzaPc Group a to jmenovitě doc. PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D., Mgr. Filipu Kostelanskému, Mgr. Míše Kolářové, Mgr. Honzovi Kollárovi, Mgr. Lucce Kočiščákové, protože díky nim byla v laboratoři přátelská atmosféra. Nesmím zapomenout poděkovat kolegovi PharmDr. Lukáši Lochmanovi, Ph.D. za věcný a humoristický pohled na různé problémy. Nemały dík patří i všem ostatním členům naší Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za odbornou pomoc a pohodové pracovní prostředí.

Poděkování patří profesoru Tomasu Torresovi a docence Marii Victorii Martínéz-Díaz (oba z Universidad Autónoma de Madrid) za možnost strávit svou zahraniční stáž v jejich laboratořích.

Obrovské poděkování naleží mojí rodině – zejména mamce, tatškovi, sestřičce Aniče a snoubence Verunce za pochopení a podporu během mého dlouhého studia.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory těchto grantů či programů:

Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK: 1168217, 494214)

Grantová agentura České republiky (GAČR: 17-19094S, 20-09212S)

Specifický vysokoškolský výzkum (SVV 260 547, 260 401)

Univerzitní výzkumné centrum UK (UNCE 33/2012)



# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: **Mgr. Jiří Demuth**

Školitel: **doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.**

Konzultant: **prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Disertační práce: **Studium azaftalocyaninů jako zhášeců v oligodeoxynukleotidových sondách**

Ftalocyaniny (Pcs) a azaftalocyaniny (AzaPcs) jsou planární makrocyclické sloučeniny, které mají čistě syntetický původ, byť jsou odvozeny od přírodních barviv – porfyrinů. Díky rozsáhlému 18  $\pi$ -elektronovému konjugovanému systému mají Pcs a AzaPcs velice zajímavé fotofyzikální vlastnosti, a proto nacházejí uplatnění v elektrotechnice, jako materiál v průmyslu či v medicínálních disciplínách.

Oktaaminoalkyl substituované tetrapyrazinoporfyraziny (TPyzPzs), které patří do rodiny AzaPcs, mají díky extrémně rychlému intramolekulárnímu přenosu náboje prakticky nulovou vlastní fluorescenci. Využitím této schopnosti v oblasti vývoje fluorescenčních sond, kde se dají tyto TPyzPzs použít jako účinné zhášecí pro různé fluorofory, se zabývá tato disertační práce. Takovéto sondy mohou najít uplatnění v různorodých experimentech napříč vědními obory např. biochemie, forenzní či genetická analýza.

Syntetická část disertační práce navazuje na předchozí studium TPyzPzs v naší výzkumné skupině a popisuje návrh struktur a přípravu nesymetrických TPyzPzs určených pro jejich odlišné připojení k oligodeoxynukleotidovému (ODN) řetězci fluorescenční sondy (na jeho 3', 5' konec, respektive doprostřed sondy). Zaváděním rozdílných funkčních skupin (hydroxyl, karboxylová kyselina a/nebo azid) lze pak ovlivnit způsob připojení k ODN vláknu. Vhodnou volbou periferní substituce bylo docíleno snížení agregace látek.

Další část práce vyhodnocuje vliv periferní substituce na funkčnost hydrolyzačních sond (např. TaqMan<sup>®</sup> sond) během kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Prvně byla vyhodnocována efektivita zhášení TPyzPzs v porovnání s komerčně dostupnými zhášecí fluorescencí. Pro porovnání našich a komerčních sond pro praktické využití při qPCR byla vyvinuta v rámci této práce i modelová metoda, kde Taq polymerázu, používanou v qPCR, nahradila DNáza I. Během pozorování

absorpčních spekter bylo zjištěno, že i po navázání na ODN sondu tvoří TPyzPzs J-dimery, které jsou pro sloučeniny typu TPyzPz a obecně i Pc velmi netypickými formami agregace.

Poslední část disertační práce se zabývá právě detailním popisem tvorby J-dimerů u TPyzPzs. Vliv různých faktorů na agregaci je popsán jak na samotných TPyzPzs v organických rozpouštědlech, tak po navázání na ODN sondu a po provedení experimentů v prostředí hybridizačního pufru. Zajímavým fenoménem u ODN sond popsaným poprvé v této práci je tvorba unikátního supramolekulárního heterotetrameru tvořeného J-dimerem TPyzPzs a dvěma molekulami fluoresceinu.



# ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Author: **Mgr. Jiří Demuth**

Supervisor: **doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.**

Consultant: **prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Doctoral Thesis: **Study of azaphthalocyanines suitable for quenching of fluorescence in oligodeoxynucleotide probes**

Phthalocyanines (Pcs) and azaphthalocyanines (AzaPcs) are planar macrocyclic compounds. These synthetic compounds are derived from naturally occurring dyes – porphyrins. Pcs and AzaPcs have very interesting photophysical properties due to their extensive 18  $\pi$ -electron conjugated system. They are used in electrotechnics, material industry or in medicinal applications.

Octaalkylamino substituted tetrapyrzino porphyrazines (TPyzPzs), which belong to AzaPc family, can quench fluorescence of other molecules due to the ultrafast intramolecular charge transfer. This thesis studies this quenching ability of TPyzPzs with the aim to develop efficient fluorescence probes. Such probes could find application in a variety of experiments across scientific disciplines i.e. – biochemistry, forensic or genetic analysis.

Synthetic part of dissertation thesis is a continuation of previous investigation of TPyzPzs in our research group. It describes design and preparation of low symmetrical TPyzPzs suitable for different binding to oligodeoxynucleotide (ODN) chain of a fluorescent probe (at 3', 5'-end or into the middle of the chain). This binding to ODN chain is enabled by various functional groups (hydroxyl, azide, and/or carboxylic acid) attached to TPyzPz. Suitable peripheral groups hinder undesirable aggregation.

Next part of the thesis assesses the effect of peripheral substitution on usability of hydrolysis probes (e.g. TaqMan<sup>®</sup> probes) in quantitative polymerase chain reaction (qPCR). First, comparison of quenching efficiency of TPyzPzs with commercially available quenchers is described. For this purpose, we developed a model method, which simulates behavior of probes during qPCR. The principle of this simplified method lays in the usage of DNase I instead of Taq polymerase employed in qPCR. We found out that

J-dimers, which is a rare type of aggregation of Pcs and AzaPcs, are formed even after binding TPyzPzs to ODN chain.

Final part of the dissertation thesis deals with the detailed study of the formation of J-dimers. Influence of different factors on behavior of TPyzPzs was investigated in organic solvent and after binding to ODN chain in hybridization buffer. Self-assembly into a unique heterotetramer formed by the J-dimer of TPyzPzs and two molecules of fluorescein was described for the first time.

## Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Seznam použitých zkratk  | 13 |
| 2     | Formulace problematiky a způsob řešení                             | 15 |
| 3     | Cíle práce   | 16 |
| 4     | Přehled současného stavu řešené problematiky                       | 17 |
| 4.1   | Základní principy fluorescence                                     | 17 |
| 4.2   | Zhášení fluorescence   | 18 |
| 4.2.1 | Typy zhášení fluorescence  | 18 |
| 4.2.2 | Mechanismy zhášení fluorescence                                    | 21 |
| 4.3   | Metody detekce sekvence DNA  | 22 |
| 4.3.1 | Polymerázová řetězová reakce                                       | 23 |
| 4.3.2 | Sondy používané v PCR  | 24 |
| 4.3.3 | Fluorofory   | 27 |
| 4.3.4 | Zhášecí fluorescence   | 31 |
| 4.4   | Ftalocyaniny a azaftalocyaniny                                     | 33 |
| 4.4.1 | Fotofyzikální vlastnosti   | 36 |
| 4.4.2 | Vznik supramolekulárních útvarů                                    | 38 |
| 4.4.3 | Aplikace   | 40 |
| 5     | Metodická část   | 43 |
| 5.1   | Vazba TPyzPz na oligodeoxynukleotidový řetězec                     | 43 |
| 5.2   | Hodnocení účinnosti zhášení u připravených DNA sond                | 45 |
| 5.3   | Popis vybraných fotofyzikálních vlastností                         | 45 |
| 5.3.1 | Kvantový výtěžek produkce singletového kyslíku ( $\Phi_{\Delta}$ ) | 45 |
| 5.3.2 | Kvantový výtěžek fluorescence ( $\Phi_F$ )                         | 47 |
| 5.4   | Hodnocení supramolekulárních agregátů                              | 47 |
| 6     | Výsledky a diskuse   | 50 |
| 6.1   | Syntéza zamýšlených látek  | 51 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 6.1.1 | Syntéza prekurzorů .....   | 51 |
| 6.1.2 | Syntéza TPyzPzs .....  | 54 |
| 6.1.3 | Syntéza a purifikace ODN sond .....  | 59 |
| 6.2   | Tvorba J-dimerů.....   | 62 |
| 6.3   | Fotofyzikální vlastnosti.....  | 66 |
| 6.4   | Studium TPyzPzs po navázání na ODN řetězec .....   | 68 |
| 6.4.1 | Porovnání efektivity zhášení TaqMan <sup>®</sup> sond s TPyzPz proti sondám s komerčními zhášeči ( <b>P1</b> ) ..... | 68 |
| 6.4.2 | Studium tvorby J-dimerů u ODN řetězců ( <b>P2</b> ).....   | 72 |
| 7     | Závěr.....   | 79 |
| 8     | Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací.....  | 80 |
| 9     | Seznam použité literatury .....  | 83 |
| 10    | Seznam příloh.....   | 94 |

# 1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|        |   |
|--------|---|
| ACN    | acetonitril   |
| AzaPc  | azaftalocyanin (z angl. Azaphthalocyanine)  |
| BODIPY | 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (boron dipyrromethene)                            |
| CFR610 | CAL Fluor Red 610   |
| CPG    | pevná fáze (z angl. Controlled pore glass)  |
| CTC    | komplex přenosu náboje (z angl. Charge transfer complex)                                    |
| Cy5    | Cyanine 5   |
| DBCO   | 11,12-didehydro-5,6-dihydrodibenz[b,f]azocin (dibenzoazacyklooktyn)                         |
| DCP    | 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril  |
| DMF    | dimethylformamid  |
| DMSO   | dimethylsulfoxid  |
| DPBF   | 1,3-difenylisobenzofuran  |
| FAM    | 6-karboxyfluorescein fosforamidit   |
| FRET   | Fösterův rezonanční přenos energie (z angl. Förster resonance energy transfer)              |
| HOMO   | nejvyšší obsazený molekulový orbital (z angl. Highest occupied molecular orbital)           |
| HPLC   | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High-performance liquid chromatography)     |
| ICT    | intramolekulární přenos náboje (z angl. Intramolecular charge transfer)                     |
| NMR    | nukleární magnetická rezonance  |
| ODN    | oligodeoxynukleotid   |
| Pc     | ftalocyanin (z angl. Phthalocyanine)  |
| PCR    | polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)                            |
| PDT    | fotodynamická terapie (z angl. Photodynamic therapy)  |
| PET    | světlem vyvolaný přenos elektronu (z angl. Photoinduced electron transfer)                  |
| PS     | fotosenzitizér (z angl. Photosensitizer)  |
| QE     | účinnost zhášení (z angl. Quenching efficiency)   |
| qPCR   | kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. Quantitative polymerase chain reaction) |

|        |  |
|--------|--|
| RET    | rezonanční přenos energie (z angl. resonance energy transfer)  |
| TAMRA  | 5-karboxytetramethylrhodamin                                   |
| THF    | tetrahydrofuran  |
| TLC    | tenkovrstvá chromatografie (z angl. Thin layer chromatography) |
| TPyzPz | tetrapyrazinoporfyrazinů (z angl. tetrapyrazinoporphyrin)      |
| ZnPc   | nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin                          |

## 2 FORMULACE PROBLEMATIKY A ZPŮSOB ŘEŠENÍ

Studium genetické informace buňky je v dnešní době velice rozšířené napříč různými vědními obory např. biochemie, genetika, analytická chemie či forenzní analýza. Principem těchto studií je sledování změn fluorescence, buď jejího nárůstu nebo úbytku. K tomu je nezbytné, aby byla v analýze přítomna fluorescenční molekula a většinou i molekula, která má schopnost fluorescenci naopak zhaset, obě navázané na oliodeoxynukleotidovém (ODN) řetězci, který slouží jako rozeznávací jednotka.<sup>1</sup>

Většina komerčních molekul, které jsou používány jako zhasěče fluorescence, má ale omezení v univerzálnosti použití – je nutná pečlivá volba zhasěče v závislosti na použitém fluoroforu a metodě analýzy např. v případě, že je třeba docílit zhasení pomocí rezonančního přenosu energie (RET, viz dále), je nezbytný překryv emisního spektra fluoroforu a absorpčního spektra zhasěče.<sup>2</sup> Bohužel neexistuje zhasěč, který by byl schopný absorbovat fluorescenci všech běžně používaných fluoroforů.

Naše výzkumná skupina „Azaphthalocyanine Group“ se 20 let zabývá přípravou a studiem vlastností ftalocyaninů (Pcs) a azaftalocyaninů (AzaPcs) a jejich použitím jako fotosenzitizérů pro fotodynamickou terapii (PDT)<sup>3</sup> a nebo jako senzory pro kationty kovů<sup>4</sup> či pH.<sup>5</sup>

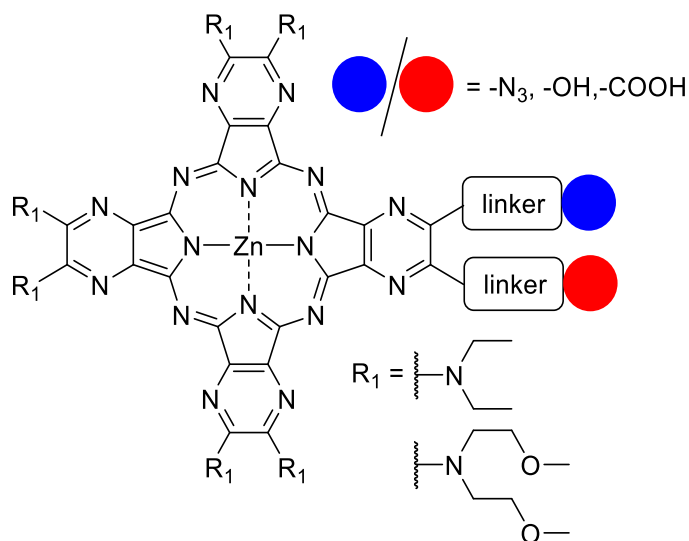
Před 11-ti lety bylo v naší skupině zjištěno možné použití oktaalkylamino substituovaných tetrapyrazinoporfyrazinů (TPyzPzs) jako zhasěčů fluorescence.<sup>6</sup> Planární skelet TPyzPzs napomáhá tvorbě heterodimeru s fluoroforem, což je nezbytné pro statické zhasení fluorescence. TPyzPz mají oproti komerčním zhasěčům výhodu v šířce absorpčního spektra, a tudíž mají předpoklad pro to, aby se staly univerzálními zhasěči fluorescence v ODN sondách, které umožňují kromě běžného statického zhasení i fungování na principu *rezonančního přenosu energie*. Samozřejmou vlastností nových zhasěčů by měla být nulová vlastní fluorescence, což oktaalkylamino substituované TPyzPzs bez problému splňují díky ultrarychlému *intramolekulárnímu přenosu náboje*.<sup>7</sup>

Vlastnosti alkylamino TPyzPzs ve vztahu k jejich využití jako zhasěčů fluorescence byly naší skupinou poměrně detailně prostudovány, nicméně stále chybí detailnější studium jejich vlastností po navázání na ODN řetězec a porovnání jejich praktické využitelnosti s komerčními zhasěči. Nutným krokem je i vývoj takových TPyzPzs, které budou vhodné pro vazbu do libovolného místa řetězce ODN. Tyto kroky by měly být zodpovězeny řešením mé disertační práce.

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem mé disertační práce byla syntéza nesymetrických TPyzPzs, které mohou být využitelné jako univerzální zhášeece fluorescence během kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Následně jsem studoval jejich chování během hybridizačních testů.

První část práce se zabývala návrhem a syntézou jednotlivých nesymetrických TPyzPzs typu AAAB a dále studiem jejich fotofyzikálních vlastností. Pro dosažení maximálního intramolekulárního přenosu náboje, který je zodpovědný za nulovou vnitřní fluorescenci TPyzPz, byla zvolena oktaalkylaminová substituce na periferii makrocyklu. Jedna isoindolová jednotka vždy nesla funkční skupiny nezbytné pro navázání TPyzPz na ODN sondu (Obr. 1). Následná syntéza ODN sondy byla prováděna ve společnosti GENERI BIOTECH (Hradec Králové, Česká republika), se kterou naše výzkumná skupina dlouhodobě spolupracuje. Dodatečná modifikace a purifikace ODN sond probíhala zpět na půdě farmaceutické fakulty ve spolupráci s doc. PharmDr. Radimem Kučerou, Ph.D.



Obr. 1 Obecné schéma připravených nesymetrických TPyzPzs.

Druhá část mé disertační práce byla zaměřena na vyhodnocování efektivity zhášení fluorescence na zjednodušeném modelu qPCR ve srovnání s komerčně dostupnými zhášeeči.

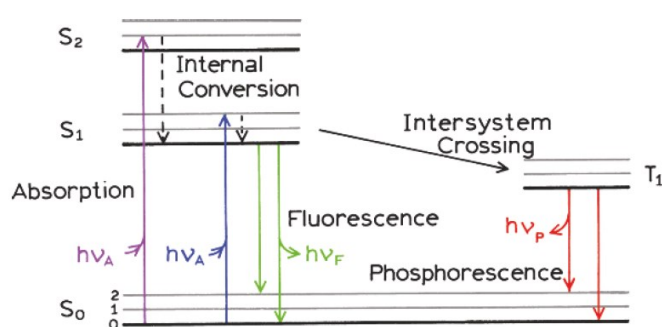
V třetí části disertační práce jsem studoval vliv periferní substituce na tvorbu supramolekulárních agregátů jak v organických rozpouštědlech, tak i po navázání na ODN řetězec.



## 4 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 4.1 Základní principy fluorescence

Fluorescence je schopnost molekuly zbavit se přijaté energie vyzářením fotonu. Ze strukturního hlediska je pro sloučeninu nutné, aby obsahovala konjugované dvojně vazby. Právě systém konjugovaných dvojných vazeb umožňuje látce absorbovat světelné záření. Pro snadné vysvětlení dějů mezi absorpcí záření a fluorescencí je vhodné použít modifikovaný Jablonského diagram (Obr. 2).<sup>8</sup>



Obr. 2 Modifikovaný Jablonského diagram (vysvětlení v textu).Převzato z literatury.<sup>8</sup>

Molekula se může z energetického hlediska nacházet v základním stavu ( $S_0$ ) či ve stavech excitovaných ( $S_1$  nebo  $S_2$ ). Jednotlivé stavy mají ještě další dělení na energetické hladiny. V případě, že sloučenina v základním stavu ( $S_0$ ) absorbuje foton, tak je excitována do některé z vyšších energetických hladin stavů  $S_1$  nebo  $S_2$ . Následně pomocí vnitřní konverze ztrácí energii přechodem z vyšší energetické hladiny na základní energetickou hladinu stavu  $S_1$  nebo  $S_2$ , které jsou termodynamicky stabilnější a tato změna trvá cca  $10^{-12}$  s, což je mnohem rychlejší než fluorescence ( $10^{-8}$  s). Z nejnižší energetické hladiny stavu  $S_1$  následně dochází k emisi fotonu – fluorescenci. Fluorescenční spektrum je zrcadlovým obrazem spektra absorpčního (Franck-Condonovo pravidlo<sup>9</sup>) a je posunuto bathochromně (k červené oblasti spektra) a to z důvodu ztráty energie způsobené vnitřním přechodem popsáným výše.<sup>10</sup> Tento fenomén se označuje jako Stokesův posun a je velice účinný k predikci vlnové délky maxima a tvaru příslušného emisního spektra neznámé sloučeniny.

Z excitovaného stavu  $S_1$  může sloučenina relaxovat také mezisystémovým přechodem, který vede k tripletovému stavu  $T_1$ . V případě stavu  $T_1$  se hovoří o stavu spinově zakázaném, protože elektrony mají v orbitalech souhlasný spin, což je relativně

ojedinelý stav. Z nejnižší energetické hladiny  $T_1$  může molekula relaxovat fosforescencí, předáním energie jiné molekule v tripletovém stavu či přijmutím tepelné energie a návratem do excitovaného stavu  $S_1$ . Pokud sloučenina relaxuje fosforescencí, tak je spektrum ještě více bathochromně posunuto než v případě fluorescence. Přenos energie na jinou molekulu v tripletovém stavu (např. tkáňový kyslík –  $^3O_2$ ) je principem fotodynamické terapie (PDT, z angl. Photodynamic therapy).<sup>11</sup> V případě absorpce tepelného záření molekulou ve stavu  $T_1$  dochází po jejím návratu do stavu  $S_1$  k tzv. opožděné fluorescenci.<sup>8</sup>

## 4.2 Zhášení fluorescence

Existují případy, kdy molekula fluoroforu absorbuje požadovanou energii pro svoji excitaci, ale ve výsledku není měřitelná skoro žádná fluorescence nebo změřené emisní spektrum neodpovídá emisnímu spektru daného fluoroforu. Výše zmíněný jev je způsoben zhášením fluorescence fluoroforu jinou molekulou přítomnou ve vzorku. Principiálně je možné rozdělit typy zhášení na kolizní, statické zhášení a na rezonanční přenos energie.<sup>12</sup>

### 4.2.1 Typy zhášení fluorescence

#### 4.2.1.1 Kolizní zhášení

Kolizní zhášení někdy také označované za zhášení dynamické spočívá v interakci excitovaného stavu fluoroforu se zhášečem. Tato interakce je zprostředkována náhodnými srážkami dvou molekul v souvislosti s jejich difúzním pohybem v roztoku. Excitovaný fluorofor se po srážce se zhášečem vrací do základního stavu, aniž by vyzářil foton. Tento děj je popsán Stern-Volmerovou rovnicí:<sup>13</sup>

$$\frac{F}{F_0} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q]$$

*Rovnice 1* Fluorescence bez přítomnosti zhášeče ( $F_0$ ), fluorescence v přítomnosti zhášeče ( $F$ ), bimolekulární konstanta zhášení ( $k_q$ ), doba života fluorescence bez přítomnosti zhášeče ( $\tau_0$ ), koncentrace zhášeče ( $[Q]$ ), Stern-Volmerova konstanta ( $K_D = k_q \times \tau_0$ ).

Z Rovnice 1 vyplývá, že poměr mezi fluorescencí bez zhášeče a se zhášečem by měl být nepřímo úměrný koncentraci zhášeče. Bimolekulární konstanta se mění v závislosti na komplexním složení roztoku, a čím složitější sloučeniny (např. biomolekuly) jsou přítomny v roztoku, tím je její význam větší. Jsou známi i případy, kdy biomolekula dokáže „ochránit“ fluorofor takovým způsobem, že se objeví jeho plná fluorescence.<sup>14</sup>

#### 4.2.1.2 Statické zhášení

Spočívá v přímém kontaktu fluoroforu se zhášečem, což má za následek nemožnost excitace fluoroforu či jeho okamžitou relaxaci do základního stavu bez emise fotonu. Konstantu statického zhášení ( $K_S$ ) lze vyjádřit vztahem:

$$K_S = \frac{[F \cdot Q]}{[F][Q]}$$

Rovnice 2 koncentrace komplexu fluorofor-zhášeč ( $[F \cdot Q]$ ), koncentrace fluoroforu ( $[F]$ ), koncentrace zhášeče ( $[Q]$ ).

Ze vztahu Rovnice 2 lze vyjádřit podobnou závislost jako u kolizního zhášení – viz Rovnice 3:

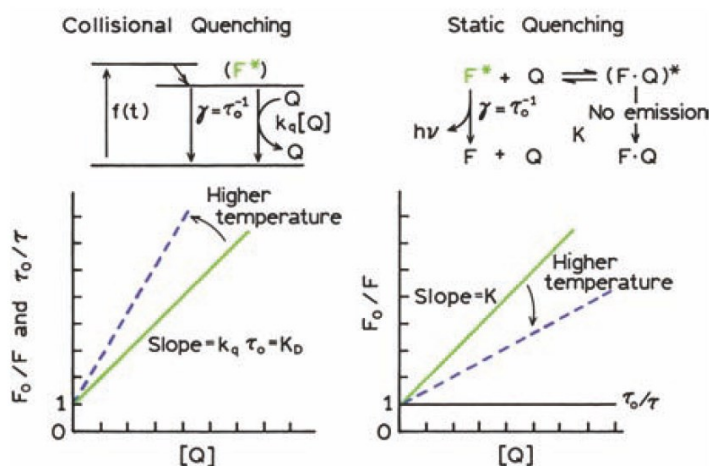
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D[Q]$$

Rovnice 3 Fluorescence bez přítomnosti zhášeče ( $F_0$ ), fluorescence v přítomnosti zhášeče ( $F$ ), koncentrace zhášeče ( $[Q]$ ), konstanta statického zhášení ( $K_S$ ).

Fluorofor v tomto případě vytváří komplex s druhou molekulou. Může se jednat o (homo)dimer v případě, že molekula zháší samu sebe, nebo se může jednat o heterodimer v případě, že zhášeč je jiné chemické struktury než fluorofor.<sup>8</sup>

#### 4.2.1.3 Rozlišení kolizního a statického zhášení.

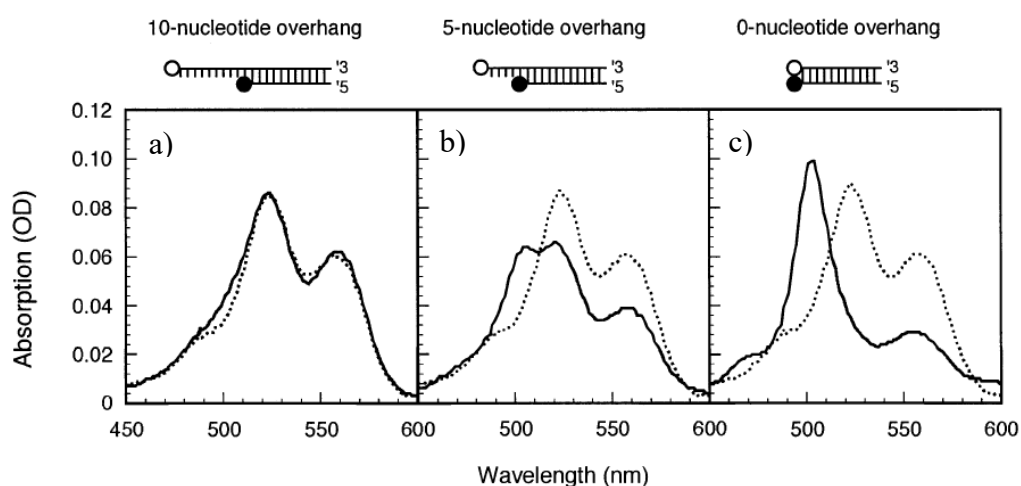
Porovnáme-li grafy závislosti poměru fluorescence bez zhášeče a se zhášečem na koncentraci zhášeče pro kolizní a statické zhášení (Obr. 3), je zřejmé, že v obou případech se jedná o lineární závislosti. Tudíž z grafu tohoto vztahu nelze vyvodit o jaký typ zhášení se jedná. Pokud chceme zjistit typ zhášení, je nutné si pomoci změnou podmínek např. teplotou. Pokud budeme zvyšovat teplotu vzorku během měření, tak se fluorescence při statickém zhášení bude zvyšovat z důvodu disociace komplexu fluorofor–zhášeč. Na druhou stranu, pokud se bude jednat o kolizní zhášení, tak fluorescence bude klesat z důvodu častější interakce difundujících molekul a tedy účinnějšího kolizního zhášení.<sup>15</sup>



Obr. 3 Porovnání obecných příkladů účinnosti zhášení fluorescence.<sup>8</sup>

Další možností, jak rozlišit typy zhášení je změření doby života fluorescence ( $\tau$ ), protože u kolizního zhášení je možné změřit určité hodnoty  $\tau$ , kdežto u statického zhášení je  $\tau$  vždy rovno nule.

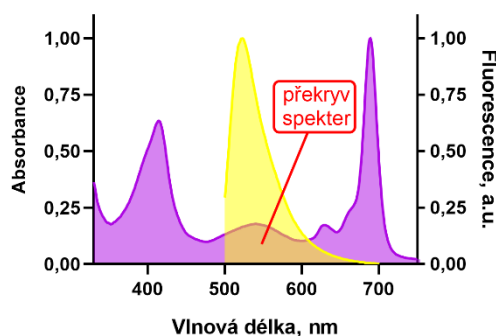
Poslední možností, jak určit typ zhášení, je porovnání absorpční spekter samotného fluoroforu, samotného zhášeče a roztoku, který obsahuje jak fluorofor, tak i zhášeč. Pokud absorpční spektra směsi obou molekul odpovídají prostému součtu jednotlivých spekter, tak se jedná o kolizní zhášení, neboť kolizní zhášení ovlivňuje pouze excitované stavy molekul. Na druhou stranu, pokud je absorpční spektrum směsi molekul rozdílné od součtu jednotlivých absorpčních spekter, došlo k tvorbě dimeru/heterodimeru, a tedy ke statickému zhášení. Důvodem je fakt, že dimer/heterodimer má odlišné elektronové vlastnosti, a tudíž i jiné absorpční spektrum (Obr. 4).



**Obr. 4** Ukázka změn v absorpčním spektru při přibližování dvou fluoroforů (tetramethylrhodamin – prázdné kolečko, tetrachlorofluorescein – plné kolečko) (a, b) až po vznik heterodimeru (c). Plná čára značí absorpční spektra hybridizovaných vláken. Tečkovaná čára je tvořena součtem absorpčních spekter jednotlivých členů před hybridizací. Převzato z literatury.<sup>16</sup>

#### 4.2.1.4 Rezonanční přenos energie

Rezonanční přenos energie (RET z anglického Resonance energy transfer) nastává, když fluorofor (donor) emituje foton, který je přijatý akceptorem. Akceptor může být fluorescenční nebo nefluorescenční molekula. Pokud je akceptorem fluorofor, tak dochází následně k emisi fluorescence o jiné vlnové délce, než by byla původní fluorescence donoru. Je-li akceptorem nefluorescenční molekula (zhášeč), tak je přijatá energie proměněna na teplo během relaxace zhášeče.<sup>17</sup> Pro RET jsou důležité dva elementy – vzdálenost mezi donorem a akceptorem a dále překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra fluoroforu (Obr. 5). Tímto jevem se zabýval v polovině 20. století Theodor Förster,<sup>18</sup> který definoval účinnost RET ( $E$ ) pomocí následujícího vztahu (Rovnice 4):



*Obr. 5 Ukázka překryvu emisního spektra fluoresceinu (žlutá) a absorpčního spektra TPyzPz zhášeče (fialová).*

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

*Rovnice 4 Vzdálenost mezi donorem a akceptorem ( $r$ ), Försterův poloměr ( $R_0$ ).*

Försterův poloměr ( $R_0$ ) vyjadřuje vzdálenost, při které je přenos energie právě 50 %, a dá se odvodit ze vzájemného překryvu emisních a absorpčních spekter a orientace donoru s akceptorem.  $R_0$  typicky nabývá hodnot 20–60 Å. Znalost těchto vztahů lze použít třeba pro monitorování konformačních změn proteinů.<sup>19</sup> RET je někdy označován jako Försterův rezonanční přenos energie (FRET, z angl. Förster resonance energy transfer).

#### 4.2.2 Mechanismy zhášení fluorescence

V kapitole 4.2.1 bylo vysvětleno, jak dochází ke zhášení fluorescence mezi fluoroforem a zhášečem, ale už nebylo řečeno, na jakém principu dochází k relaxaci zhášeče z excitovaného stavu, což bude vysvětleno v této kapitole.

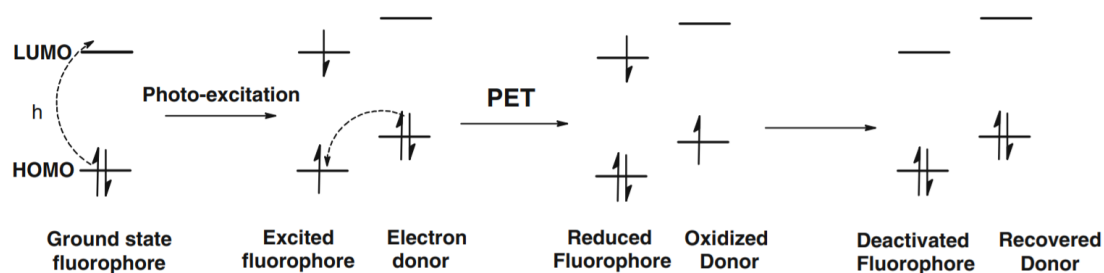
##### 4.2.2.1 Mezisystémový přechod

Zhášeč po excitaci do  $S_1$  může za určitých okolností přejít mezisystémovým přechodem do stavu  $T_1$ , který má dlouhou životnost. Právě díky dlouhé životnosti tripletového stavu může docházet následně k relaxaci díky interakci dvou zhášečů (tím se vyruší jejich tripletové stavy a relaxují do základního stavu) nebo nezářivou relaxací z tripletového stavu uvolněním vibrační energie (tepla).<sup>8</sup> Většinou tyto děje probíhají současně a jeden z nich bývá dominantní. Sloučeniny v tripletovém stavu jsou velice snadno zhášeny pomocí  $^3O_2$ .<sup>20</sup> Mezisystémovým přechodem relaxují sloučeniny nesoucí těžké atomy (např. halogeny).

##### 4.2.2.2 Světlem indukovaný přenos elektronu

Během světlem indukovaného přenosu elektronu (PET, z angl. Photoinduced electron transfer) se vytváří tzv. „charge transfer complex“ (CTC) mezi akceptorem a donorem. Následně dojde k relaxaci excitovaného stavu  $S_1$  donoru do základního stavu  $S_0$  bez vyzáření fotonu. Donor a akceptor může být i v rámci jedné molekuly, kdy tyto dvě části nejsou spojeny konjugovaným systémem. V CTC probíhá přenos elektronu z nejméně obsazeného molekulového orbitalu (HOMO, z angl. Highest occupied

molecular orbital) donoru na nejnižší neobsazený molekulový orbital a zároveň je donoru navrácen elektron z HOMO akceptoru (Obr. 6).



Obr. 6 Schématické znázornění světlem indukovaného přenosu elektronu.<sup>21</sup>

Zajímavostí toho způsobu přenosu energie je, že fluorofor může působit jako donor i jako akceptor v závislosti na redoxních potenciálech jednotlivých členů CTC a okolních podmínkách. Schopnost fungovat jako donor i akceptor mají například deriváty 4-amino-1,8-naftalimidu.<sup>8, 22, 23</sup>

#### 4.2.2.3 Intramolekulární přenos náboje

Princip intramolekulárního přenosu náboje (ICT, z ang. Intramolecular charge transfer) je velice podobný průběhu PET, ale s tím rozdílem, že celý systém je v konjugaci a nedochází k přenosu elektronu na určitou vzdálenost, ale jen k jeho přemístění v rámci jedné molekuly. Ve své podstatě dochází pouze ke změně elektronové hustoty v molekule za tvorby elektronového dipólu.<sup>8</sup>

### 4.3 Metody detekce sekvence DNA

Detailní studium genomu organismů bylo pro vědce dlouhou dobu za nepřekročitelnou bariérou. Od objevení mikroskopu roku 1595 (Zacharias Janssen a Anthony van Leeuwenhoek, Nizozemsko) uplynulo k definování pojmu chromozom bezmála 300 let (1888, Heinrich W. G. von Waldeyer-Hartz, Německo),<sup>24</sup> ale na bližší porozumění detailnější struktury chromozomu si musel svět počkat do roku 1953, kdy James D. Watson a Francis Crick popsali dvoušroubovici vlákna DNA.<sup>25</sup> Dalším, ne však posledním, důležitým krokem bylo představení teorie o kodonech Marshalllem W. Nirenbergem na konferenci v Moskvě roku 1961 (ve spolupráci s J. Heinrichem Matthaeiem).<sup>26</sup>

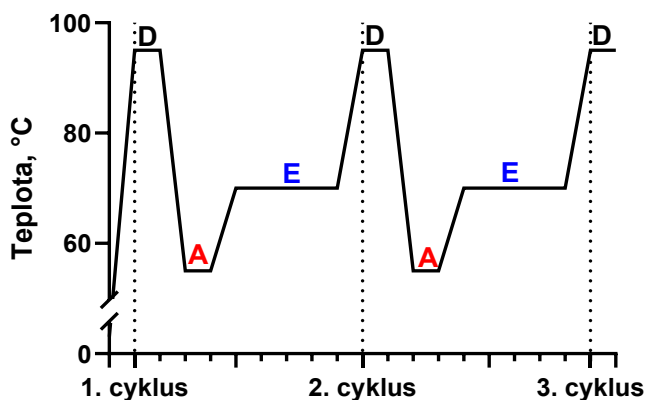
První metodou na poli cytogenetiky byla fluorescenční *in situ* hybridizace, která sloužila ke zvýraznění specifických sekvencí na chromozomech.<sup>27, 28</sup> Dále byly vyvinuty komparativní genomová hybridizace či metody hybridizačních čipů.<sup>24</sup> Těmito metodami

se ale nedaly pozorovat malé změny na úrovni nukleotidů, jejichž pozorování umožnilo až objevení polymerázové řetězové reakce (PCR, z angl. polymerase chain reaction).<sup>29</sup>

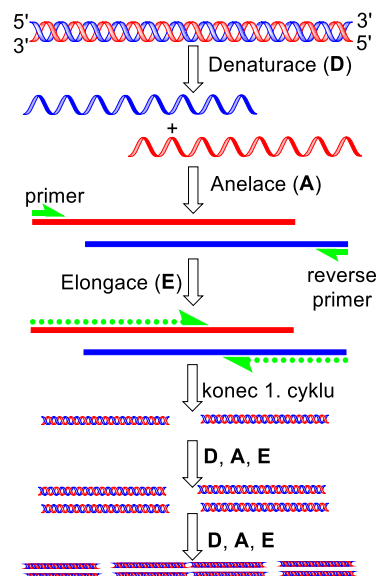
#### 4.3.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR, jež byla objevena roku 1984 americkým vědcem Kary Mullisem, slouží k zmnohonásobení určité sekvence DNA, čehož v dnešní době využívá mnoho vědních oborů (biochemie, molekulární biologie, forenzní analýza, aj.). Pro PCR jsou nezbytné čtyři věci – předlohová DNA, primer, Taq polymeráza a deoxynukleosidtrifosfáty. Samotná PCR probíhá v opakujících se cyklech, ve kterých vždy vznikne dvojnásobek DNA než do daného cyklu vstupoval. Každý cyklus se skládá z několika fází – denaturace, nasednutí primeru (anelační fáze) a syntéza nové DNA kondenzací deoxynukleosidtrifosfátů přítomných v roztoku (elongační fáze).<sup>1</sup>

Během denaturační fáze dochází k zahřátí vzorku na 94–98 °C po dobu 20-30 vteřin (Obr. 7), a tudíž k rozvolnění sekundární struktury DNA. Poté je vzorek ochlazován na 50–60 °C a během této doby dochází k hybridizaci (nasednutí) primeru, od kterého pak může začít syntéza nové DNA. Samotná syntéza komplementárního vlákna je zprostředkována enzymem „Taq polymerázou“, který je aktivní při 68–72 °C (Obr. 8).<sup>30</sup>



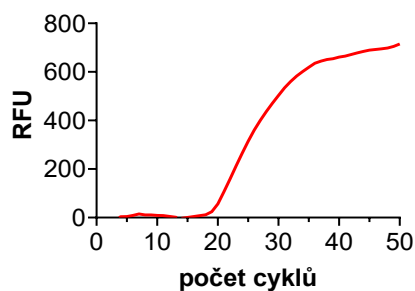
Obr. 7 Teplotní schéma jednotlivých fází během PCR –  
D = denaturační fáze, A = anelační fáze, E = elongační fáze.



Obr. 8 Schéma jednotlivých fází PCR a naznačení exponenciálního růstu množství nových kopií.

Samotná PCR se používá v několika verzích, z nichž moderním trendem je kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR, z angl. quantitative polymerase chain reaction) nebo někdy označovaná jako PCR v reálném čase. Výhodou qPCR je možnost monitorování průběhu multiplikace DNA v reálném čase, což ale není možné bez

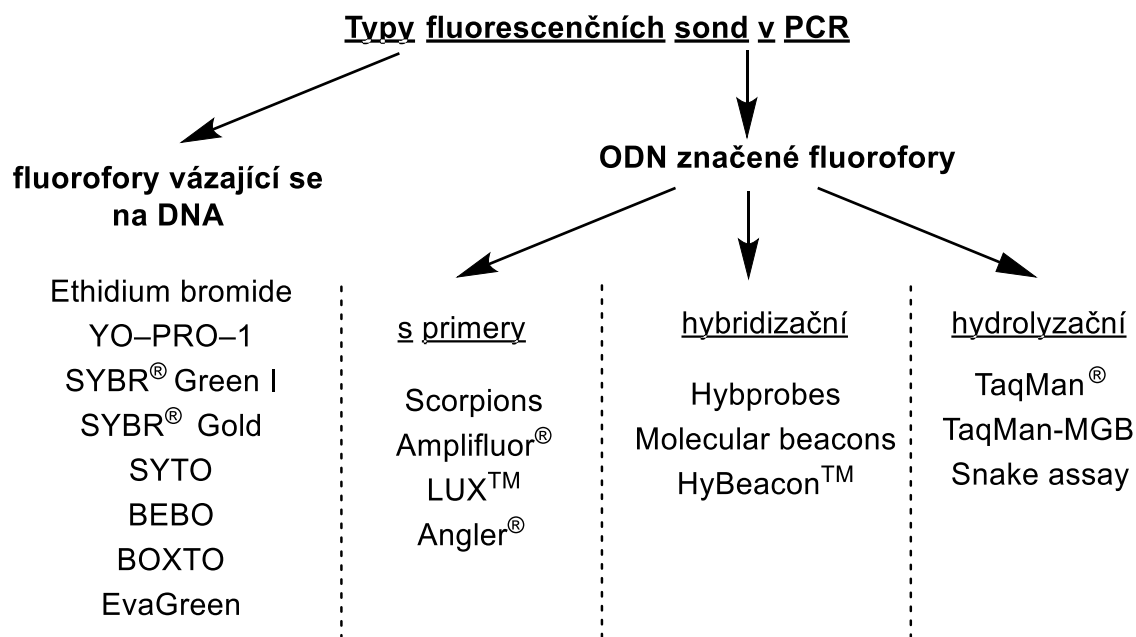
přítomnosti signálních molekul ve vzorku. Tyto signální molekuly – **sondy** – mají schopnost fluorescence a v závislosti na typu sondy se v průběhu qPCR fluorescence snižuje nebo zvyšuje. Po každém cyklu qPCR je proto změřena fluorescence reakční jamky. Získaná hodnota fluorescence vynesena do grafu závislosti graf změny fluorescence na počtu cyklů amplifikace (Obr. 9).



Obr. 9 Záznam průběhu qPCR – relativní fluorescence (RFU).

#### 4.3.2 Sondy používané v PCR

Primární členění sond vychází z přítomnosti či nepřítomnosti oligodeoxynukleotidového (ODN) řetězce v signální molekule, tudíž signální molekula je samotný fluorofor nebo fluorofor navázaný na ODN řetězci (Obr. 10). Mezi sondy s fluoroforem vázaným na ODN řetězec patří: sondy s primery, hybridizační sondy, hydrolyzační sondy a dále by bylo možné do této skupiny zahrnout MGB sondy a analoga nukleových kyselin.



Obr. 10 Základní rozdělení fluorescenčních sond v PCR.<sup>1</sup>



#### 4.3.2.1 Fluorofory vázající se na DNA

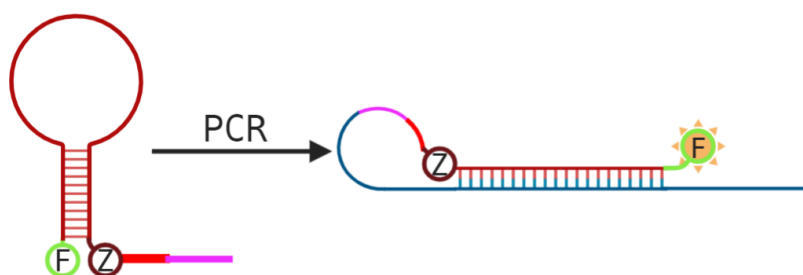
Jedná se o molekuly, které pokud jsou volně v roztoku, tak nevykazují fluorescence. Po jejich interakci s dvoušroubovicí DNA vazbou do malého žlábků DNA dojde k nárůstu fluorescence. Principem vzniku fluorescence může být samotná interakce s DNA nebo „schování se“ před kyslíkem v roztoku, který jejich fluorescence jinak zhasí. Odečet nárůstu fluorescence se provádí během elongační fáze.<sup>31, 32</sup> Řadí se sem SYBR<sup>®</sup> Green, EvaGreen, ethidium bromid. Fluorofory interagující s DNA se používají k detekci bakterií rodu *Salmonella*<sup>33</sup> či geneticky modifikovaných organismů v potravinářství.<sup>34</sup>

#### 4.3.2.2 ODN sondy nesoucí fluorofory

V případě těchto sond se jedná vždy o spojení ODN s fluoroforem, popřípadě i zhasěčem, kovalentní vazbou. Dělí se na základě přítomnosti primeru a dále pak na principu rozsvícení. V následujícím textu budou detailněji popsány pouze některé typy sond.

#### Scorpion probes

Tzv. Scorpion probe je ve své podstatě ODN řetězec nesoucí fluorofor, zhasěč a neštěpitelnou vazbou připojený primer.<sup>35</sup> Pokud je tato sonda volně v roztoku, zaujímá tvar vlásenky. Fluorofor a zhasěč jsou v tomto případě blízko sebe a dochází ke zhasení fluorescence (Obr. 11). Během elongační fáze je sonda včleněna do nového vlákna DNA, protože zároveň obsahuje primer, od kterého začíná replikace DNA. Po denuraci sonda následně hybridizuje s dosyntetizovaným vláknem DNA. Díky hybridizaci dojde k oddálení fluoroforu od zhasěče, což má za následek nárůst fluorescence. Detekce příslušného signálu fluorescence probíhá v denurační fázi. Tyto sondy se dají využít např. k detekci parazitů,<sup>36</sup> bakterií.<sup>37, 38</sup>

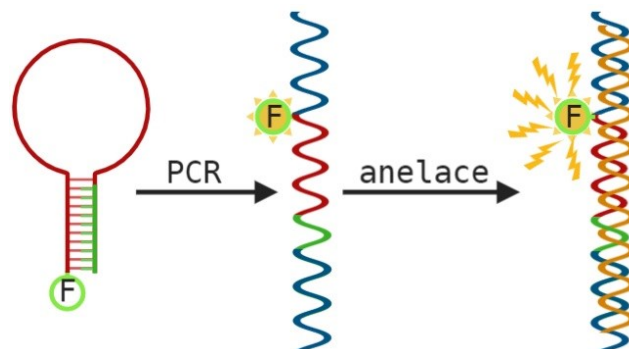


Obr. 11 Schéma principu Scorpions probe – fluorofor (F), zhasěč (Z), tučná červená čára značí neštěpitelnou vazbu mezi primerem (růžová čára) a zhasěčem.<sup>39</sup>

#### LUX<sup>™</sup>

LUX<sup>™</sup> je zkratkou pro light-upon-extention,<sup>40</sup> což vystihuje i princip této sondy. Sonda se skládá z ODN řetězce s fluoroforem a primerem (Obr. 12). Pokud je sonda volně v roztoku zaujímá tvar vlásenky, kdy naproti fluoroforu je sekvence bohatá na guanosen,

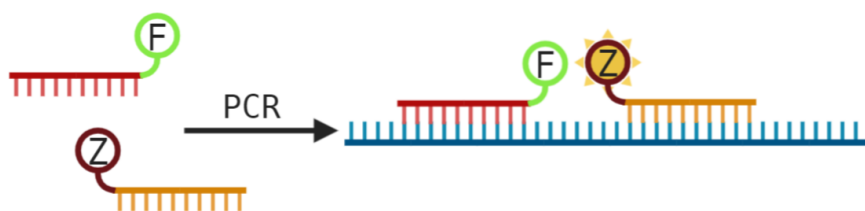
který má schopnost zhášet fluorescence. Během elongační fáze se stane sonda lineární, a tudíž se zvyšuje její fluorescence, která dosáhne maxima po hybridizaci s komplementárním vláknem.<sup>41</sup> Detekce fluorescence probíhá v elongační fázi. V praxi se tato sonda používá například k detekci jedné z příčin gastroenteritidy.<sup>42</sup>



Obr. 12 Schéma principu LUX™ – fluorofor (F), zelená část vlásenky odkazuje na přítomnost primeru začleněného v sondě.<sup>39</sup>

### Hybprobes (FRET sondy)

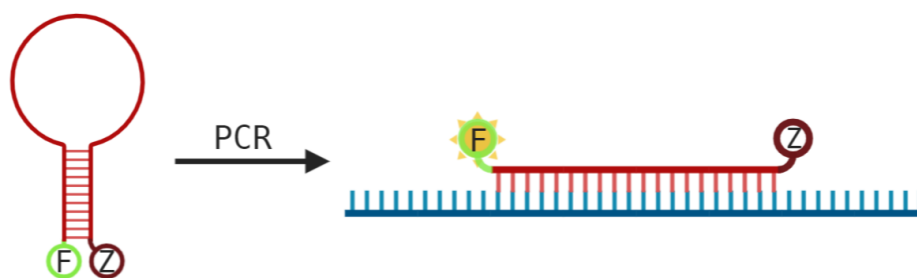
Tento systém se skládá ze dvou samostatných sond, kde na jedné sondě je na 3'-konci fluorofor a na druhé sondě je na 5'-konci zhášec (Obr. 13). Během anelační fáze nasednou sondy na vlákno DNA tak, že konce sond s fluoroforem a zhášečem jsou blízko sebe, tudíž fluorofor po ozáření emituje foton, který je hned absorbován zhášečem, který sice fluoreskuje, ale emitované světlo má jinou vlnovou délku, než je fluorescence emitovaná fluoroforem. Detekce fluorescence probíhá v anelační fázi. Tímto způsobem mohou být detekovány viry<sup>43</sup> či mykobakterie.<sup>44</sup>



Obr. 13 Schéma principu Hybprobes – fluorofor (F), zhášec (Z).<sup>39</sup>

### Molecular beacons

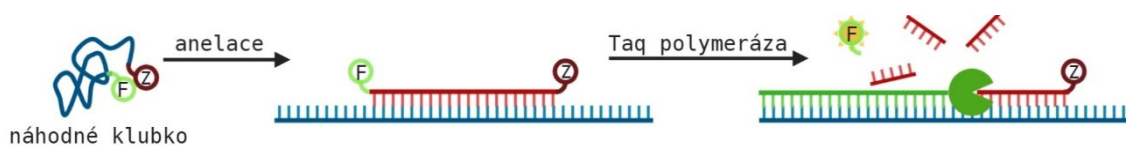
V případě tzv. Molecular beacons se jedná o sondu, která zaujímá tvar vlásenky díky částem řetězce, které jsou k sobě vzájemně komplementární. Je značena fluoroforem a zhášečem na jednotlivých koncích (Obr. 14). Během anelační fáze hybridizuje sonda s komplementárním vláknem, tudíž dojde k oddálení fluoroforu od zhášeče a k nárůstu fluorescence.<sup>45</sup> Detekce fluorescence probíhá v anelační fázi. Sondy založené na tomto principu se používají například k detekci adenoviru.<sup>46</sup>



Obr. 14 Schéma principu Molecular beacons – fluorofor (F), zhášec (Z).<sup>39</sup>

### TaqMan<sup>®</sup> sondy

TaqMan<sup>®</sup> sondy se skládají z ODN řetězce, fluoroforu a zhášec. Fluorofor je většinou na 5'-konci a zhášec je na 3'-konci. ODN vlákno, které spojuje fluorofor se zhášecem není komplementární samo se sebou, tudíž netvoří žádnou pravidelnou sekundární strukturu. Pokud je sonda v roztoku, tak se vytváří tzv. náhodné klubko (angl. random coil). Sonda v roztoku nevykazuje fluorescence (nebo minimální), protože možné fluorescence je zabráněno vytvořením heterodimeru mezi fluoroforem a zhášecem. Tento heterodimer je rozvolněn během anelační fáze, kdy sonda hybridizuje ke komplementární sekvenci DNA (Obr. 15), a v tomto okamžiku dojde k malému nárůstu fluorescence. Dominantní úlohu ale nakonec hraje exonukleázová aktivita DNA polymerázy, která během elongační fáze rozštěpí sondu na malé fragmenty, což má za následek oddálení fluoroforu od zhášec, a tudíž skokový nárůst fluorescence. Detekce fluorescence probíhá během elongační fáze. Tento typ sond lze použít např. k detekci myonecrosis viru<sup>47</sup>, ke studiu predispozic k rakovině slinivky<sup>48</sup> či viru žloutenky B.<sup>49</sup>



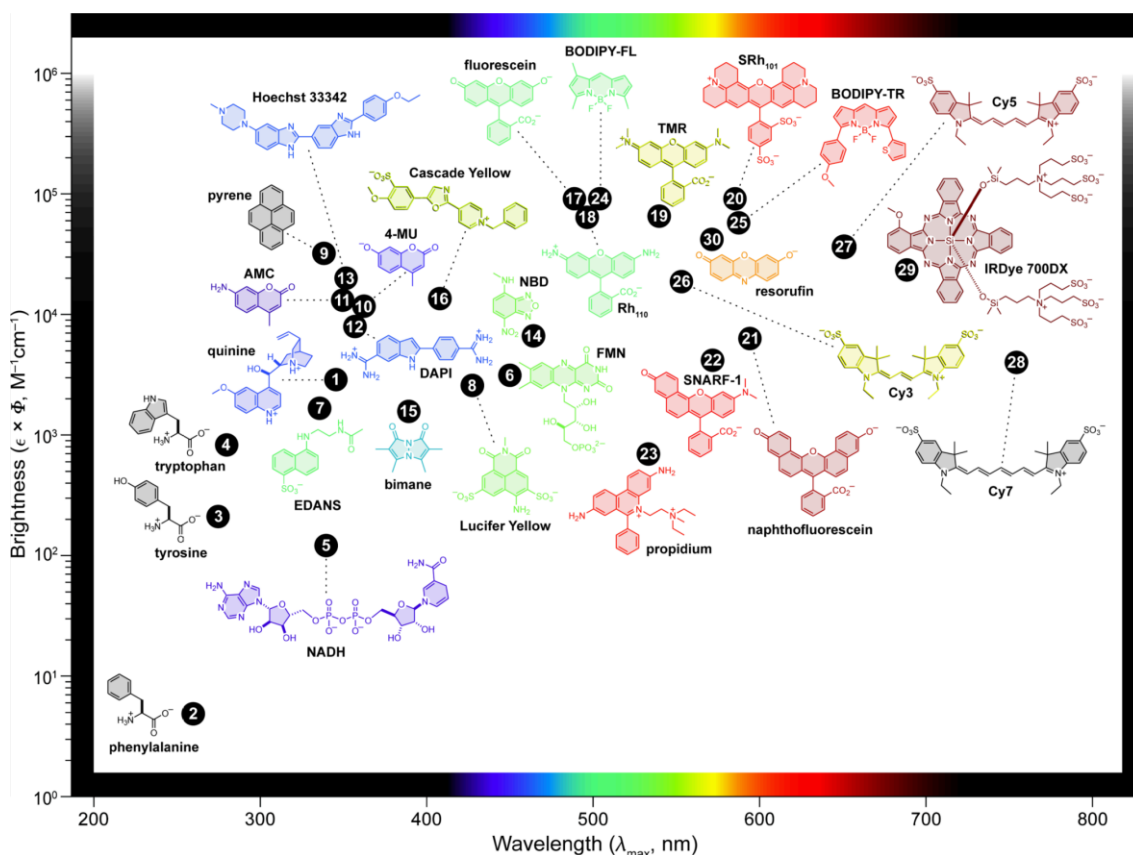
Obr. 15 Schéma principu TaqMan<sup>®</sup> sond – fluorofor (F), zhášec (Z), DNA polymeráza (zelená kruhová výseč).<sup>39</sup>

### 4.3.3 Fluorofory

Mezi fluorofory, což jsou sloučeniny schopné fluorescence, patří syntetická barviva, ale i několik endogenních molekul (např. karotenoidy, flavinadeninindinukleotid či nikotinamidadeninindinukleotid).<sup>50</sup> Tato kapitola se ale především zabývá fluorofory, které se používají při detekci DNA. Jejich vlastnosti jsou přehledně shrnuty v Tabulce 1 a Obr. 16. Fluorofory lze dělit z mnoha hledisek – dle použití, vlnové délky emise či dle chemické struktury. Pro zkomplikování situace jsou některé fluorofory různě modifikovány, čímž získáme různě aktivované deriváty s modifikovanými vlastnostmi oproti předlohovým fluoroforům.

Tabulka 1 Přehled fluoroforů a jejich fotofyzikálních vlastností. Převzato a upraveno.<sup>51</sup>

| Fluorophore           | Solvent              | $\lambda_{\max}$ (nm) | $\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) | $\lambda_{em}$ (nm) | $\Phi$ | $\epsilon \times \Phi$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------|--------|--|
| quinine 1             | pH 2                 | 347                   | 5 400                          | 448                 | 0.55   | 3 000                                      |
| phenylalanine 2       | H <sub>2</sub> O     | 260                   | 200                            | 282                 | 0.024  | 5  |
| tyrosine 3            | H <sub>2</sub> O     | 275                   | 1 500                          | 303                 | 0.14   | 210  |
| tryptophan 4          | H <sub>2</sub> O     | 280                   | 6 300                          | 348                 | 0.13   | 820  |
| NADH 5                | H <sub>2</sub> O     | 340                   | 6 200                          | 435                 | 0.019  | 120  |
| FMN 6                 | H <sub>2</sub> O     | 450                   | 12 200                         | 530                 | 0.25   | 3 100                                      |
| EDANS 7               | H <sub>2</sub> O     | 336                   | 6 100                          | 520                 | 0.27   | 1 600                                      |
| Lucifer Yellow 8      | H <sub>2</sub> O     | 428                   | 12 300                         | 535                 | 0.21   | 2 600                                      |
| pyrene 9              | MeOH                 | 340                   | 43 000                         | 376                 | 0.75   | 32 000                                     |
| 4-MU 10               | pH 10                | 360                   | 17 000                         | 450                 | 0.63   | 11 000                                     |
| AMC 11                | MeOH                 | 351                   | 18 000                         | 430                 | 0.75   | 14 000                                     |
| DAPI 12               | H <sub>2</sub> O/DNA | 358                   | 21 000                         | 461                 | 0.34   | 7 100                                      |
| Hoechst 33342 13      | H <sub>2</sub> O/DNA | 350                   | 45 000                         | 461                 | 0.38   | 17 000                                     |
| NBD 14                | MeOH                 | 465                   | 22 000                         | 535                 | 0.3    | 7 000                                      |
| bimane 15             | pH 7.4               | 390                   | 5 300                          | 482                 | 0.3    | 2 000                                      |
| Cascade Yellow 16     | MeOH                 | 409                   | 24 000                         | 558                 | 0.56   | 13 000                                     |
| fluorescein 17        | pH 9                 | 490                   | 93 000                         | 514                 | 0.95   | 88 000                                     |
| Rh <sub>110</sub> 18  | pH 7.5               | 496                   | 74 000                         | 517                 | 0.92   | 68 000                                     |
| TMR 19                | MeOH                 | 540                   | 95 000                         | 565                 | 0.68   | 65 000                                     |
| SRh <sub>101</sub> 20 | pH 7                 | 586                   | 108 000                        | 605                 | 0.77   | 83 000                                     |
| naphthofluorescein 21 | pH 9.5               | 595                   | 44 000                         | 660                 | 0.14   | 6 200                                      |
| SNARF-1 22            | pH 10                | 573                   | 44 000                         | 631                 | 0.092  | 4 100                                      |
| propidium 23          | H <sub>2</sub> O/DNA | 535                   | 5 400                          | 617                 | 0.13   | 700  |
| BODIPY-FL 24          | MeOH                 | 505                   | 91 000                         | 511                 | 0.94   | 86 000                                     |
| BODIPY-TR 25          | MeOH                 | 588                   | 68 000                         | 616                 | 0.84   | 57 000                                     |
| Cy3 26                | pH 7                 | 554                   | 130 000                        | 568                 | 0.14   | 18 000                                     |
| Cy5 27                | pH 7                 | 652                   | 200 000                        | 672                 | 0.18   | 36 000                                     |
| Cy7 28                | pH 7                 | 755                   | 200 000                        | 778                 | 0.02   | 4 000                                      |
| IRDye 700DX 29        | H <sub>2</sub> O     | 689                   | 165 000                        | 700                 | 0.14   | 23 000                                     |
| resorufin 30          | pH 9.5               | 572                   | 56 000                         | 585                 | 0.74   | 41 000                                     |

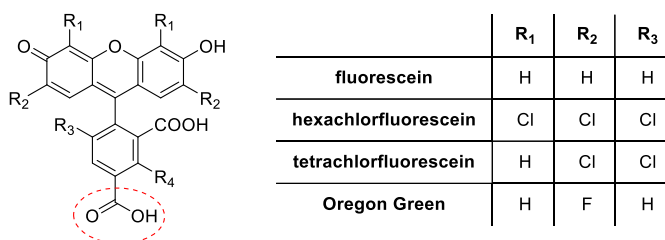


Obr. 16 Přehled základních struktur jednotlivých fluoroforů v závislosti na jejich emisní vlnové délce a na jejich svítivosti. Převzato z literatury.<sup>51</sup>

Pokud se má hovořit o rozdělení fluoroforů dle struktury, tak mezi hlavní skupiny patří: deriváty xanthenu, deriváty indocyaninu, deriváty 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu – známe jako BODIPY (z angl. boron dipyrromethene) a další strukturní typy.

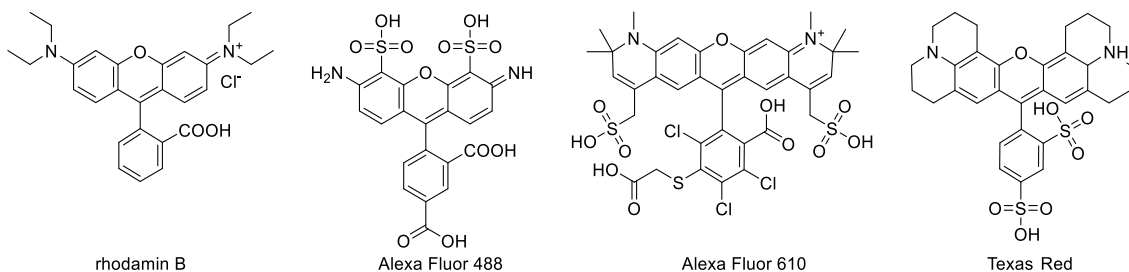
#### 4.3.3.1 Deriváty odvozené od xanthenu

Společným činitelem těchto látek je různě substituovaný xanthen, což dalo vznik dvěma hlavním rodinám v této kategorii – deriváty fluoresceinu a rhodaminu.<sup>51</sup> **Fluorescein** byl prvně syntetizován roku 1871 (Adolf von Baeyer, Německo), což z něj činí velice starý fluorofor, který je díky svým výhodným vlastnostem především ve vodném prostředí hojně využívaný dodnes. Fluorescein má vysoký extinkční koeficient ( $9,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), absorpční maximum ( $\lambda_{\text{max}}$ ) při 490 nm a emisní maximum ( $\lambda_{\text{em}}$ ) při 514 nm. Jedna z nevýhod fluoresceinu vyplývá z toho, že jeho nejúčinnější forma je dianion, tudíž jeho kvantový výtěžek fluorescence je závislý na pH prostředí.<sup>8, 52</sup> Na druhou stranu, většina biologických testů se provádí za standardizovaných podmínek a v pufru, takže s opakovatelností výsledků není problém.<sup>53</sup> Díky různorodé substituci (-F, -Cl, amino, methyl, sulfonyl) byly vlastnosti fluoresceinu modifikovány pro rozličné použití (Obr. 17).



Obr. 17 Struktura vybraných derivátů fluoresceinu. Červeně zvýrazněna karboxylová funkce, která se používá pro připojení k biomolekulám.

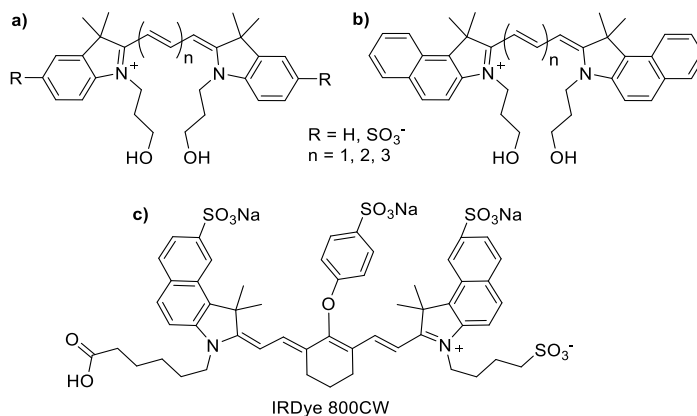
**Rhodamin** je odvozený od fluoresceinu substitucí hydroxylových skupin za aminoskupiny (Obr. 18). Rhodaminy jsou méně náchylné na změnu pH prostředí, ale na rozdíl od derivátů fluoresceinu mají nižší kvantový výtěžek fluorescence ( $\Phi_F$ ).



Obr. 18 Přehled fluoroforů odvozených od rhodaminu.

#### 4.3.3.2 Fluorofory odvozené od indocyaninu

Jedná se o molekuly, které ve své struktuře obsahují řetězec konjugovaných dvojných vazeb, který spojuje dvě indolová jádra. Cyaninová barviva se označují dle počtu spojovacích atomů uhlíku mezi jednotlivými indolovými jádry – Cy3 ( $n = 1$ ), Cy5 ( $n = 2$ ), Cy7 ( $n = 3$ ) (Obr. 19a).<sup>54</sup>

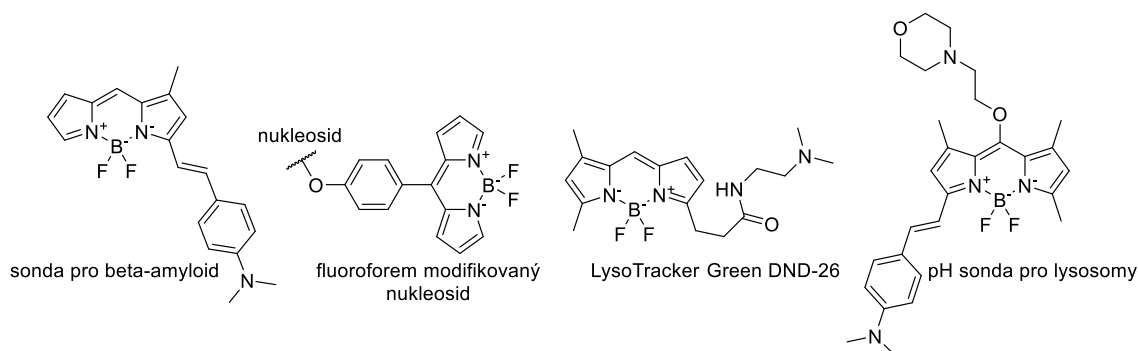


Obr. 19 Přehled indocyaninových barviv.

Pokud je k indolovému skeletu přikondenzováno benzenové jádro, tak dochází k posunu  $\lambda_{\max}$  a  $\lambda_{\text{em}}$  o 30–40 nm k červené oblasti spektra. Že se jedná indocyanin s rozšířeným aromatickým systémem lze poznat z označení CyX.5 (např Cy3.5) (Obr. 19b). Základní cyaninový skelet může být modifikován sulfonací pro zlepšení rozpustnosti a zabránění agregace ve vodném prostředí (vliv na posun spektra je v takovém případě už minimální). Zajímavým derivátem indocyaninových barviv je IRDye 800 CW (Obr. 19c), které má  $\lambda_{\text{em}}$  při 819 nm.<sup>55</sup>

#### 4.3.3.3 BODIPY

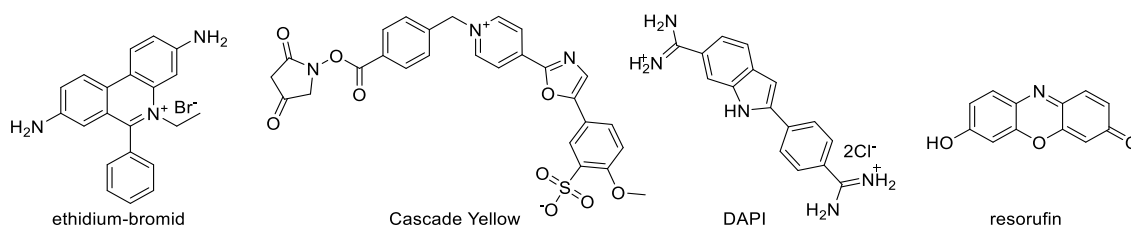
Deriváty boron dipyrromethenu jsou pro výhodné vlastnosti (rozpustnost ve vodě, úzké emisní pásy, vysokou chemickou stabilitu, minimální rozklad světlem, malou agregaci, vysoké extinkční koeficienty) hojně využívány.<sup>56</sup> BODIPY mohou být využity ve fluorescenční mikroskopii pro detekci subceluárních struktur,<sup>57</sup> jako pH senzor v buňkách,<sup>58</sup> pro modifikaci nukleosidů<sup>59</sup> či ke značení  $\beta$ -amyloidových plaků<sup>60</sup> (Obr. 20).



Obr. 20 Modifikace BODIPY dle využití.

#### 4.3.3.4 Další strukturní typy

Do této skupiny fluoroforů patří sloučeniny absorbující a emitující napříč celým viditelným spektrem. Patří sem molekuly ze skupiny fenanthridinů, které slouží k detekci DNA (ethidium-bromid)<sup>14</sup> (Obr. 21). Jako další sloučenina sloužící jako fluorofor vázaný na DNA je DAPI ze skupiny fenyлиндolů.<sup>61</sup> Cascade Yellow se používá v průtokové cytometrii.<sup>62</sup> Dále do této kategorie dále například patří sensorická molekula pro hydrazin založená na skeletu resorufinu.<sup>63</sup>



Obr. 21 Fluorofory jiných struktur.

#### 4.3.4 Zhášecí fluorescence

Zhášecí fluorescence lze definovat jako sloučeniny, jenž mají schopnost potlačit či úplně eliminovat fluorescenci ostatních látek. Pro správný výběr zhášecí při návrhu ODN sondy nesoucí pár fluorofor-zhášecí, je nutné se zamyslet nad typem sondy, zamýšleným mechanismem zhášení, použitým fluoroforem a na základě použitého fluoroforu vybrat vhodný zhášecí, který musí splňovat dvě podmínky. Pokud má docházet ke zhášení přes RET, tak je důležitý překryv emisního spektra fluoroforu a absorpčního spektra zhášecí. Druhým požadavkem je dostatečná chemická stabilita zhášecí tak, aby se neměnil za podmínek používaných při syntéze ODN vlákna v DNA syntetizátoru. Zhášecí je totiž zpravidla umístěn na 3'-konec sondy, od něhož začíná i samotná syntéza sondy v DNA/RNA syntetizátorech, a je tedy přítomen po celou dobu syntézy ODN.<sup>12, 64</sup>

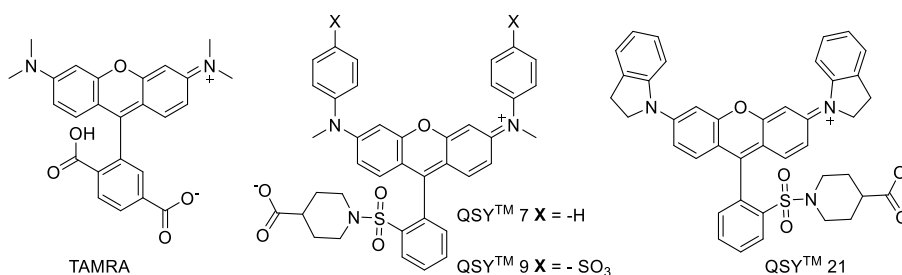
Pokud se jedná o samotné rozdělení zhášecí, tak je lze rozdělit buď dle času objevu na generace nebo dle chemické struktury. Prvně byl využíván 5-karboxytetramethylrhodamin (TAMRA), který ale vykazoval svoji vlastní fluorescenci

( $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$ ).<sup>65</sup> Další molekuly už spadaly do kategorie tzv. „*dark quenchers*“, což je označení pro zhášeče, které nemají vlastní fluorescenci. Nepřítomnost fluorescence zhášeče vede ke snížení fluorescence neaktivované sondy, což zvyšuje přesnost odečtu fluorescence ve vlastní metodě. Přesto *dark quenchers* z první generace, nebyly tak výhodné, protože absorbovaly pouze v úzké části absorpčního spektra, což omezovalo jejich univerzálnější použití. Z jejich zástupců je třeba zmínit deriváty 4-(fenyldiazenu)anilinu (např. Epoch Eclipse™ Quencher, DABCYL<sup>66</sup>). Druhá generace zahrnuje *dark quenchers*, které už mají širší absorpční spektra, ale stále je třeba použít více zhášečů k pokrytí celého spektra. Nehledě na fluorofory Cy5.5 a Cy7, které emitují v oblasti 700 nm a výše, kde existuje jen velice omezené množství zhášečů.<sup>67</sup> Mezi zástupce druhé generace se řadí série zhášečů Black Hole Quenchers® (BHQ®), Iowa Black® Quenchers a BlackBerry® Quenchers (BBQ®).

Druhou možností, jak rozdělit zhášeče, je dle jejich struktury. Toto dělení je přehlednější, a tudíž bude nadále využito. Zhášeče jsou odvozené od xanthenu, difenyldiazenu či strukturně atypické.

#### 4.3.4.1 Zhášeče odvozené od xanthenu

Do této skupiny patří TAMRA (Obr. 22), který byl uvedený do praxe jako první zhášeč, ale má vlastní fluorescenci. Další série zhášečů z této skupiny byla odvozena od rhodaminu jeho *N,N'*-diaryl substitucí, což má za následek eliminaci fluorescence. Právě mezi *N,N'*-diaryl substituované rhodaminy patří QSY™ 7, QSY™ 9 a QSY™ 21 vyvinuté firmou *Molecular probes* (dnes v concernu Thermo Fisher Scientific, USA).

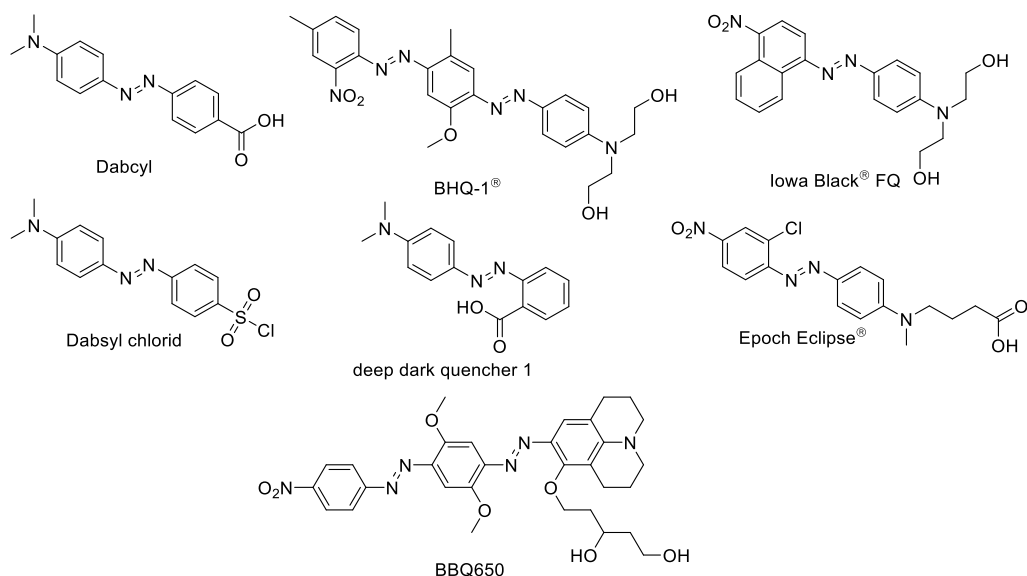


Obr. 22 Zhášeče odvozené od xanthenu.

#### 4.3.4.2 Zhášeče odvozené od difenyldiazenu

Do této největší a nejčastěji používané skupiny zhášečů patří rozličně substituované deriváty difenyldiazenu první i druhú generace zhášečů (Dabsyl, Epoch Eclipse™ quencher, Dabcyl, Iowa Black™ FQ) (Obr. 23). V některých případech je difenyldiazenu substituován v poloze 4 fenyldiazanylem, jako je to u BHQ-1® , BHQ-2® nebo BlackBerry™ Quencher 650.<sup>68, 69</sup> Tyto zhášeče absorbují mezi 450-650 nm.

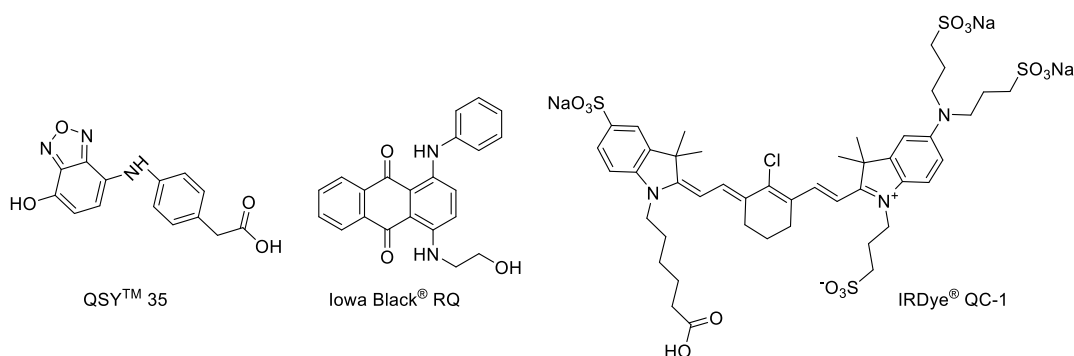




Obr. 23 Příklady zhášeců z kategorie difenyldiazenu.

#### 4.3.4.3 Strukturně atypické zhášecě

Patří sem například další zhášec vyvinutý firmou *Molecular probes* QSY<sup>®</sup> 35, který má jako základ *N*-fenylbenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-amin (Obr. 24). Dalším příkladem může být zhášec Iowa Black<sup>®</sup> QR, který je odvozený od 1,4-diamino-9,10-antrachinonu. Iowa Black<sup>®</sup> QR je určen pro zhášení fluorescence mezi 500-700 nm, protože jeho absorpční maximum je při 651 nm.<sup>70</sup> Můžeme zde i nalézt zhášec IRDye<sup>®</sup> QC-1, který je odvozený od fluoroforu Cy7 a dokáže zhášet až v NIR (500-800 nm).<sup>67</sup>

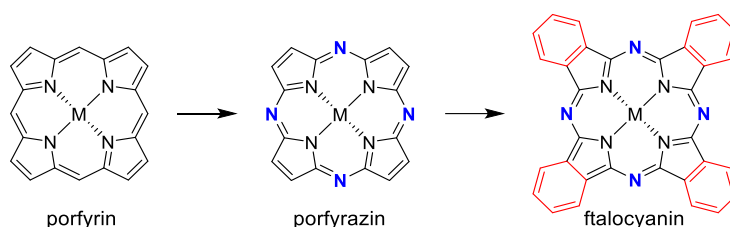


Obr. 24 Struktury atypických zhášeců.

## 4.4 Ftalocyaniny a azaftalocyaniny

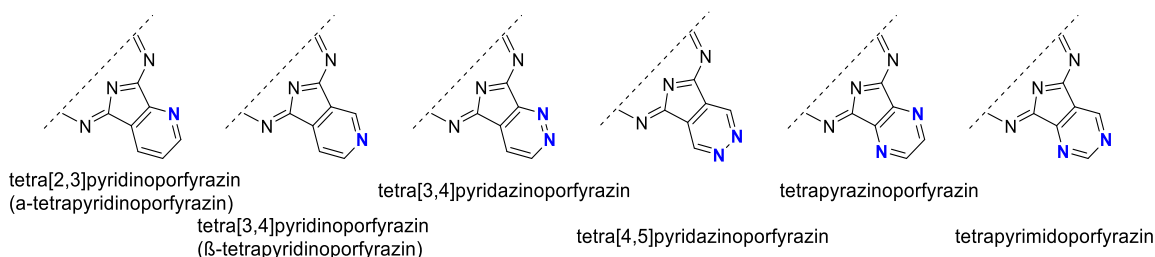
Ftalocyaniny (Pcs, z angl. Phthalocyanines) jsou makrocyclické planární molekuly s rozsáhlým 18  $\pi$ -elektronovým systémem konjugovaným dvojných vazeb. Z hlediska původu se jedná o čistě syntetické sloučeniny odvozené od porfyrinů, které se v přírodě hojně vyskytují (chlorofyl, hem B). První zmínka o syntéze Pcs pochází z roku 1907, kdy vznikly jako vedlejší produkt při přípravě 2-kyanobenzamidu.<sup>71</sup> Zájem o Pcs

ale vzrostl až ve 30. letech 20. století, kdy probíhal jejich výzkum v laboratořích Reginalda P. Linstead, který je i prvně označil za ftalocyaniny.<sup>72</sup> Samotná molekula Pc se skládá ze 4 isoindolových jednotek, které jsou v polohách 1 a 3 spojeny azomethinovými můstky (Obr. 25). Pcs mohou do svého středu koordinovat více než 70 různých kationtů kovů, polokovů (např.  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Si^{4+}$ ) či dva atomy vodíku, což má výrazný vliv na jejich vlastnosti.<sup>73</sup>



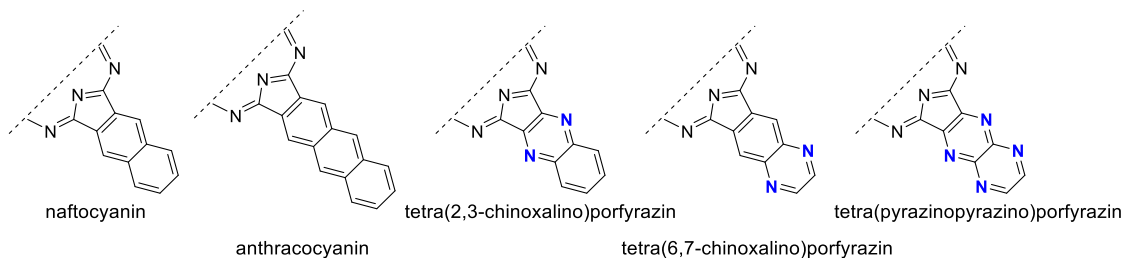
Obr. 25 Odvození ftalocyaninu, kde *M* značí centrální kationt kovu, polokovu nebo dva atomy vodíku.

Od Pcs mohou být izosterní záměnou methinových skupin benzenových jader atomy dusíku odvozeny azaanalogy, tzv. azaftalocyaniny (AzaPcs, z angl. Azaphthalocyanines). AzaPcs mají několik strukturních podtypů dle typu heterocyklu, který na makrocyklu nahrazuje benzenové jádro – tetra[2,3]pyridoporfyriziny, tetra[3,4]pyridoporfyriziny, tetrapyrimidoporfyriziny, tetra[3,4]pyridazinoporfyriziny, tetra[4,5]pyridazinoporfyriziny a tetrapyrazinoporfyriziny (TPyzPzs, z ang. tetrapyrazinoporphyrazines) (Obr. 26).



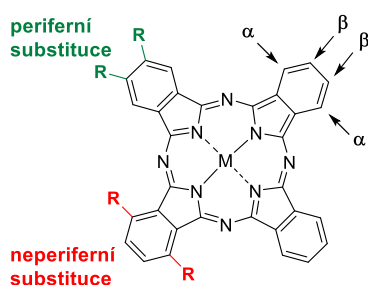
Obr. 26 Jednotlivé podtypy azaftalocyaninů.

Další modifikací základní struktury Pcs a AzaPcs je anelace dalších aromatických jader k makrocyklu. Takto lze získat naftocyaniny přikondenzováním benzenového jádra k Pcs a samozřejmě i zde je možná isosterní záměna methinových skupin za dusíky a poté vznikají tetra(2,3-chinoxalino)porfyriziny, tetra(6,7-chinoxalino)porfyriziny a tetra(pyrazinopyrazino)porfyriziny (Obr. 27).<sup>73, 74</sup>



Obr. 27 Ftalocyaniny a azaftalocyaniny rozšířené o další aromatické jádro.

Doposud byly zmiňovány pouze modifikace na úrovni záměny aromatického skeletu Pcs a AzaPcs, ale neméně významnou modifikací je substituce aromatických jader, které se dle polohy označuje za periferní ( $\beta$  poloha) nebo neperiferní ( $\alpha$  poloha) (Obr. 28). U TPyzPzs, jak již z jejich obecné struktury vyplývá, je možná pouze periferní substituce. Velkou nevýhodou těchto planárních aromatických skeletů pro většinu potenciálních aplikací je jejich tendence agregovat, tudíž tvořit dimery a vyšší agregáty (viz kapitola 4.4.2.), a právě substituce aromatických jader vhodnými substituenty může zabránit vzniku těchto agregátů.<sup>75</sup>

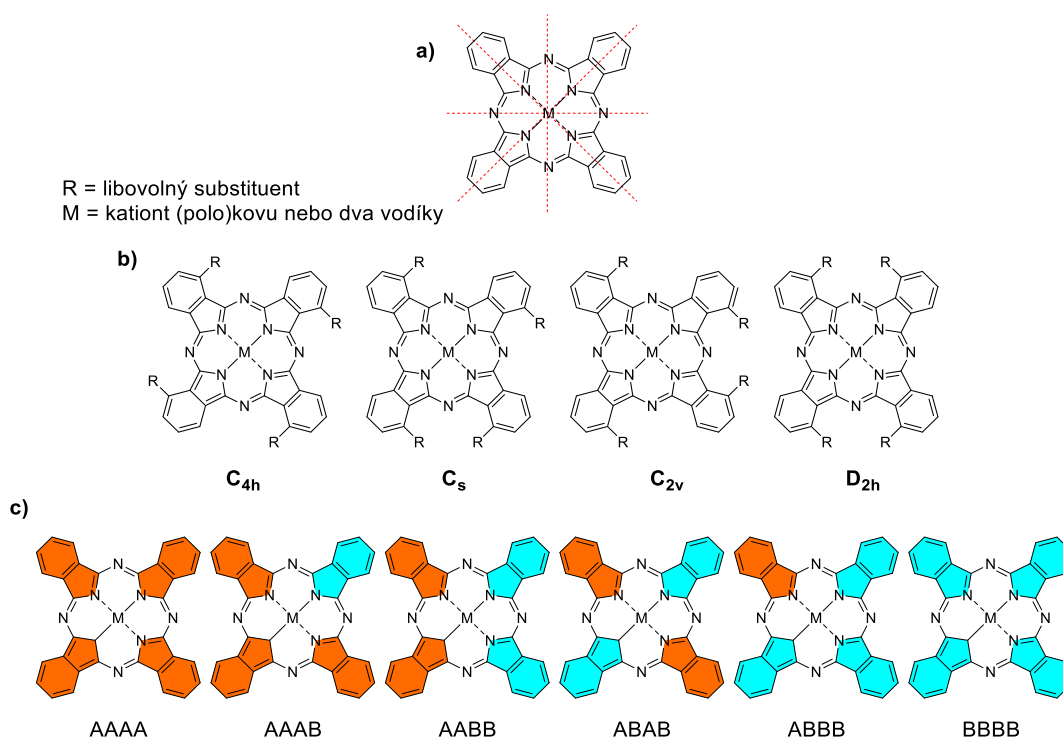


Obr. 28 Možnosti substituce u ftalocyaninu.

Existují dva přístupy, jak provádět substituci aromatických jader. První možností je postsyntetická modifikace až na makrocyclickém systému (např. sulfonace benzenových jader,<sup>76</sup> dimethoxytritylace hydroxylových skupin,<sup>77</sup> hydrolýza esterů,<sup>78</sup> alkylace terciálních dusíků<sup>3</sup>). Druhou variantou je nejprve vhodná modifikace prekurzorů před samotnou cyklotetramerizační reakcí, protože tímto způsobem je možno se vyhnout několikanásobné purifikaci již vytvořeného makrocyclického skeletu a zbytečného vystavování Pc/AzaPc reakční podmínkám během příslušné reakce.<sup>79</sup>

Pcs a AzaPcs mohou být symetrické a nesymetrické z pohledu substituce jejich jádra. Absolutně symetrické sloučeniny mají 4 různé roviny symetrie (Obr. 29a). Nesymetrické molekuly mohou vznikat, buď reakcí nesymetrických prekurzorů, v tomto případě se hovoří o polohové izomerii – jednotlivé izomery se označuje

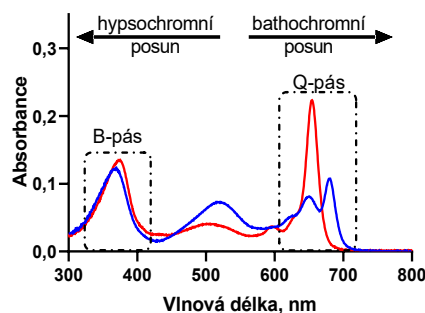
tzv. Schoenfliesovým značením<sup>80</sup> (Obr. 29b). Vzniklé polohové izomery se jen velmi těžko oddělují.<sup>81-83</sup> Druhou možností vzniku nesymetrických molekul je cyklotetramerizace dvou rozdílných prekurzorů **A** a **B** – v tomto případě se hovoří o tzv. kongenerech (Obr. 29c). Oddělení jednotlivých kongenerů je podstatně jednodušší než oddělit od sebe polohové izomery, ale separace všech 6 kongenerů je až na výjimky extrémně komplikovaná, neboť kongenery ABAB a AABB se velice špatně oddělují.<sup>84</sup> Z tohoto důvodu se tyto dva kongenery připravují většinou speciálními syntetickými postupy.<sup>85, 86</sup>



**Obr. 29** Možné typy nesymetrických Pcs a AzaPcs: **a)** zobrazení počtu rovin symetrie u nesubstituovaného Pc, **b)** polohová izomerie, **c)** výsledek cyklotetramerizační reakce 2 rozdílných prekurzorů.

#### 4.4.1 Fotofyzikální vlastnosti

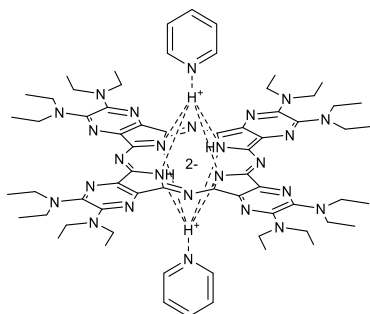
Pcs a AzaPcs absorbují díky svému konjugovanému systému dvojných vazeb světelnou energii v rozsahu 300–800 nm.<sup>87</sup> Při bližším pohledu na absorpční spektrum je zřejmá přítomnost dvou majoritních pásů – B-pás s absorpcí okolo 360 nm a Q-pás s absorpcí v rozsahu 620–750 nm (Obr. 30), což má za následek výraznou barevnost těchto látek.



Obr. 30 Vzorové absorpční spektrum – bezkovový AzaPc, zinečnatý AzaPc.

Vysokoenergetický B-pás se mění jen minimálně v závislosti na okolních podmínkách, proto je možné ho použít například k odhadu koncentrace ve variabilním prostředí. Nízkoenergetický Q-pás ( $\lambda = 600\text{--}750\text{ nm}$ ) poskytuje při detailnější analýze mnohem větší škálu informací. Pokud je Q-pás ostrý a nerozštěpený, tak to značí že se jedná pravděpodobně o symetrický Pc/AzaPcs s centrálně koordinovaným kationtem. Na druhou stranu, když je Q-pás rozštěpený, tak to značí přítomnost nesymetrie v molekule, která může být způsobena centrálními vodíky bezkovového derivátu Pc/AzaPc (pouze v případě měření spektra v nekoordinálním rozpouštědle, viz níže) nebo nesymetrickou periferní substitucí s rozdílným vlivem těchto substituentů na posun spektra. Tvar Q-pásu je ovlivněn také agregací látek (viz kapitola 4.4.2) nebo protonizací makrocyclického jádra v kyselém prostředí. Polohu Q-pásu ovlivňuje základní skelet molekuly např. izosterní záměna benzenového jádra za pyrazinové posune Q-pás od 40–50 nm hypsochromně.<sup>88</sup> Postupné rozšiřování  $\pi$ -konjugovaného systému pomocí anelovaných benzenových jader posouvá Q-pás o přibližně 20 nm bathochromně za každé nové jádro (tj. za každou záměnu isoindolové jednotky za benzo[*f*]isoindolovou jednotku).<sup>89</sup> Substituce aromatických jader nemá na posun Q-pásu tak výrazný vliv, ale i tak se jedná o velice důležitý nástroj při ladění vlastností výsledného Pc/AzaPc. Obecně lze říci, že bathochromního posunu oproti nesubstituovanému makrocyklu lze docílit, zavedeme-li na periferii alkylové ( $\sim 5\text{ nm}$ ), alkylaminové ( $\sim 15\text{ nm}$ ), thioetherové ( $\sim 20\text{ nm}$ ) skupiny, naopak hypsochromní efekt má alkoxy/aryloxy substituce ( $\sim 10\text{ nm}$ ).<sup>90</sup> Vliv použitého rozpouštědla (tzv. solvatochromní posun) na pozici Q-pásu je minimální. Větší roli hraje koordinační schopnost rozpouštědla na rozvolňování agregátů (viz kapitola 4.4.2). Zajímavé chování je pozorováno u bezkovových derivátů Pcs a AzaPcs v přítomnosti slabě bazického koordinačního rozpouštědla (dimethylformamid – DMF, pyridin, dimethylsulfoxid – DMSO), kdy dochází ke vzniku tzv. „proton transferového

komplexu“ (Obr. 31), čímž bezkovový Pc či AzaPc získává zpět symetrii a jeho Q-pás je ostrý jako u sloučeniny s centrálním kationtem.



Obr. 31 Proton transfer komplex.

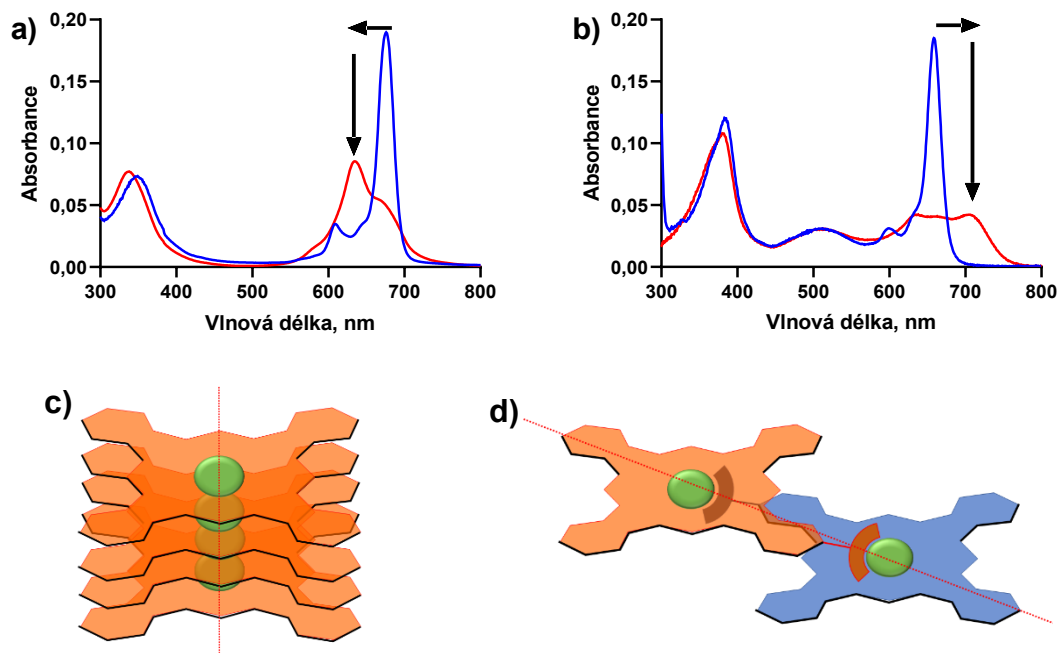
Díky systému konjugovaných vazeb mohou Pcs a AzaPcs excitovat ze svého základního stavu  $S_0$  do stavu  $S_1$  (viz Obr. 2 v kapitole 4.1) a přijatou energii vyzářit ve formě fotonu – fluorescence, či se přijaté energie zbavit nezářivými procesy. Třetí možností je mezisystémový přechod do tripletového stavu  $T_1$  a následné předání energie kyslíku ( $^3O_2$ ), který se díky tomu změní na singletový kyslík ( $^1O_2$ ) (viz kapitola 4.4.3). Účinnost přeměny přijaté energie na vlastní fluorescenci či produkci  $^1O_2$  vyjadřují tzv. „kvantové výtěžky“ (Rovnice 5), kdy jejich součet musí být vždy v rozmezí 0 až 1, neboť platí zákon zachování energie.

|  |   |
|--|---|
| kvantový výtěžek fluorescence:                     | $\Phi_F = \frac{\text{počet emitovaných fotonů}}{\text{počet absorbovaných fotonů}}$            |
| kvantový výtěžek produkce<br>singletového kyslíku: | $\Phi_\Delta = \frac{\text{počet vzniklých molekul } ^1O_2}{\text{počet absorbovaných fotonů}}$ |

Rovnice 5 Definice kvantových výtěžků dějů uplatňujících se při relaxaci excitovaných stavů Pc/AzaPc.

#### 4.4.2 Vznik supramolekulárních útvarů

Pcs a AzaPcs mají tendenci díky své planární struktuře nasedat na sebe a vytvářet supramolekulární útvary – tzv. agregáty. Agregace je většinou považována za nežádoucí vlastnost, negativně ovlivňuje fotofyzikální vlastnosti látek jako je absorpční spektrum, fluorescence či produkce  $^1O_2$  (Obr. 32a, b). Existují dva základní typy agregátů, se kterými se můžeme v případě Pcs/AzaPcs setkat – H-dimery a J-dimery.



Obr. 32 Vliv vzniku agregátů na absorpční spektrum a) H-typ agregace, b) J-typ agregace, kde červená značí agregované spektrum a modrá spektrum monomerní. Znárodnění uspořádání agregátů: c) H-dimer, d) J-dimer. Červeně je naznačena osa protínající centra jednotlivých molekul.

Obecně lze agregaci zabránit volbou vhodného koordinačního rozpouštědla (schopnost rozpouštědla koordinovat se na centrální kation Pcs/AzaPcs), vhodnou substitucí makrocyklu objemnými či nabitými substituenty.<sup>91, 92</sup> Pcs/AzaPcs s vhodným centrálním atomem (Si, Al, Ge) nabízí možnost axiální substituce, která velice dobře zabraňuje agregaci, neboť zavádí substituenty nad a pod rovinu makrocyklu.<sup>93</sup>

#### 4.4.2.1 H-typ agregace

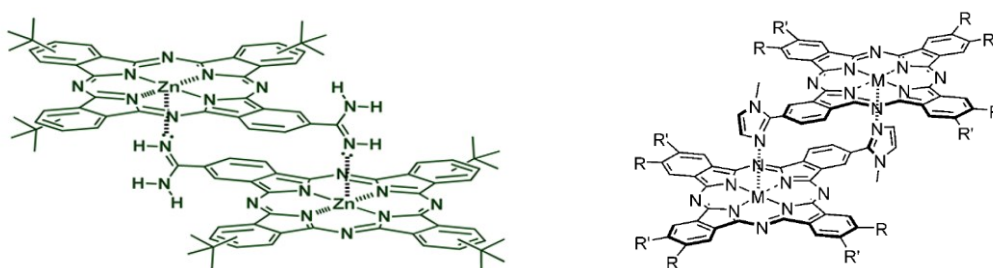
H-typ agregace, také označovaný jako „head-to-head“, se velice často vyskytuje u planárních makrocyclických molekul s konjugovaným systémem dvojných vazeb, protože je založena na interakci  $\pi$ - $\pi$  systémů.<sup>94</sup> Zjednodušeně si lze tuto agregaci představit jako stoh papírů, kde jednotlivé listy představují samotné planární molekuly, proto je i osa protínající středy molekul kolmá k jejich rovině (Obr. 32c). Vznik H-agregátů má za následek v absorpčním spektru hypsochromní posun Q-pásu a snížení jeho intenzity (Obr. 32a). Dalšími změnami u Pcs/AzaPcs je snížení rozpustnosti a změna relaxačních procesů po absorpci světla. Agregované molekuly tedy mají omezenou fluorescenci a produkci singletového kyslíku,<sup>95</sup> protože jsou poté upřednostněny nezářivé formy relaxace.

#### 4.4.2.2 J-dimery

J-typ agregace, též nazývaný „head-to-tail“, byl prvně pozorován Edwinem E. Jelleyem roku 1936.<sup>96</sup> Vznik u Pcs/AzaPcs J-agregátů může být zprostředkován částečně

$\pi$ - $\pi$  interakcemi, ale důležitější roli hraje koordinační interakce mezi donorem volného elektronového páru (např. dialkylamino skupina) a centrálního kationtu kovu.<sup>97-99</sup> Prostorové uspořádání J-typu agregátů připomíná schodiště, což znamená, že osa protínající centrální kationty kovů není kolmá k rovině makrocyklů (Obr. 32d). Různé aspekty tvorby a vlastností J-dimerů u různých typů sloučenin byly popsány v přehledném review Wurthnera a kol.<sup>100</sup>

Oktaamino substituované TPyzPzs mají schopnost se uskupovat v nekoordinačních rozpouštědlech do J-dimerů, což je v rodině AzaPcs velice ojedinělé chování, protože hlavním typem agregace u Pcs/AzaPcs je H-agregace. Právě substituce periferními skupinami obsahující dusík umožňuje vytvoření J-dimeru u Pcs/AzaPcs (Obr. 33), čímž se i zabývali zahraniční výzkumné skupiny.<sup>97, 98</sup>



**Obr. 33** Ukázka unikátních J-dimerů u Pcs. Supramolekulární uspořádání je způsobeno koordinací volných elektronových párů dusíku na periferii. Převzato z literatury.<sup>97, 98</sup>

V pilotní práci naší výzkumné skupiny jsme pozorovali velice zajímavý vliv J-agregace na fotofyzikální vlastnosti oktaamino substituovaných TPyzPzs, kdy docházelo kromě očekávaného bathochromního posunu spektra (Obr. 32b) i k výraznému ovlivnění mechanismů relaxace molekuly. Získali jsme tak systémy, které v agregovaném stavu vykazovaly vyšší  $\Phi_F$  a  $\Phi_{\Delta}$  než odpovídající monomery. Princip lze vysvětlit tak, že v monomerním stavu relaxují oktaamino substituované TPyzPzs pomocí ICT, takže nevykazují fluorescenci ani produkci  $^1O_2$ . Po jejich agregaci do J-dimerů v nekoordinačních rozpouštědlech dojde k blokování ICT, kde možným vysvětlením je sterické bránění druhou molekulou. Jako důsledek je možné pozorovat přítomnost fluorescence a produkce  $^1O_2$ .

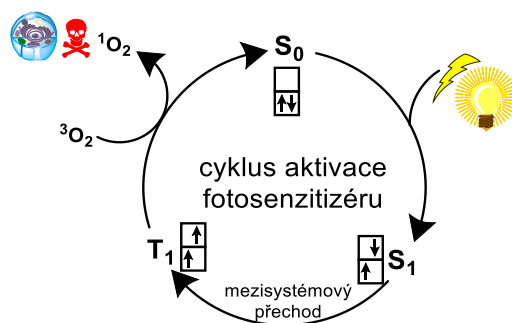
#### 4.4.3 Aplikace

Nesubstituované nebo symetricky substituované deriváty Pcs se pro svoji stabilitu a jednoduchost syntézy dočkaly širokého uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích.

Pro svoji zelenou (měďnatý hexadekachloro Pc) či modrou (nesubstituovaný měďnatý Pc) barvu jsou Pcs hojně využívány jako pigmenty v tiskařských tonerech, lacích či při obarvování plastů. Nicméně nelze opominout i jiné vlastnosti Pcs než je jen



jejich barevnost. Pcs mají polovodivé vlastnosti, a proto své uplatnění našly v elektrochemii.<sup>101-103</sup> Díky světové snaze o ekologickou rovnováhu a využití obnovitelných zdrojů energie je snaha zlepšit efektivitu solárních článků, a právě v této oblasti by velice mohly pomoci Pcs, protože mají schopnost být jak akceptory, tak donory elektronů.<sup>104-106</sup> Další využití, které souvisí s jich elektronovými vlastnostmi, je v nelineární optice<sup>107, 108</sup> či v OLED (organic light-emitting diode) technologii.<sup>109, 110</sup> Pcs našly i své medicíně uplatnění jako fotosenzitizéry (PSs, z angl. Photosensitizers) v PDT. Princip PDT spočívá v součinnosti tří samostatně netoxických činitelů – PS, světla a kyslíku. Pouze v případě, že se tyto tři elementy vyskytnou na jednom místě, dojde k požadovanému fotodynamickému účinku. PS absorbuje energii světla, je tak excitován do vyššího energetického stavu, ze kterého následně relaxuje skrze mezisystémový přechod do tripletového stavu a může tak předat svou energii tkáňovému kyslíku, který se díky tomu mění na svoji vysoce reaktivní formu tj. singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), který je cytotoxický (Obr. 34).<sup>111</sup> Jako PSs jsou většinou používány sloučeniny na bázi porfyrinů (protoporphyrin IX, verteporfín) a v Ruské federaci je od roku 2001 registrován sulfonovaný Pc (Photosens<sup>®</sup>).<sup>112</sup> Pcs se také dají použít jako senzorické molekuly na přítomnost kationtů kovů.<sup>113</sup>



**Obr. 34** Princip PDT – jedná se o nekonečný cyklus, pokud budou dostupné všechny tři složky. V ideálním případě by se měl PS regenerovat ze 100 %, ale může docházet k tzv. photobleachingu, čímž se označuje světelný rozklad PS.

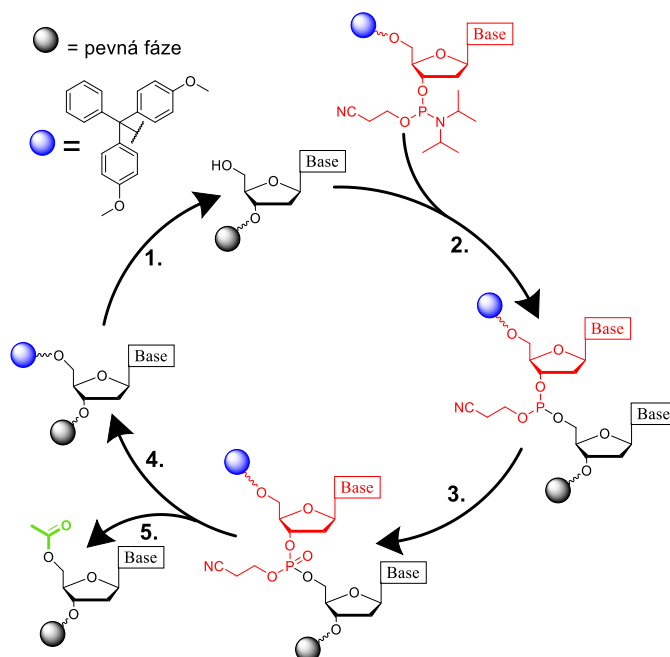
TPyzPzs, které také mají výrazné zbarvení, našly podobně jako Pcs uplatnění jako pigmenty v tiskařských tonerech,<sup>114</sup> fotoreceptory laserových tiskáren<sup>115</sup> či inkousty do tiskáren.<sup>116</sup> TPyzPzs jsou v současnosti předmětem vědeckého bádání v oblastech optických vláken, polovodivých materiálů,<sup>117</sup> detekci plynů<sup>118</sup> či fotokonverzi.<sup>90</sup> TPyzPzs jsou studovány i pro své opticky nelineární vlastnosti.<sup>119</sup> Jak již bylo řečeno v kapitole 4.4.2, TPyzPzs mají tendenci vytvářet agregáty, což je využito v technologii kapalných krystalů.<sup>120</sup> Měďnaté, železnaté či kobaltnaté TPyzPzs mohou sloužit jako katalyzátory při oxidačních reakcích.<sup>121, 122</sup> Svě uplatnění nachází TPyzPzs i ve studiu nových PSs pro PDT.<sup>76, 123-125</sup> Velmi nadějnou oblastí pro TPyzPzs design nových fluorescenčních

senzorů použitelných v biologickém prostředí. Princip tohoto použití spočívá v selektivním ovlivnění ICT efektu u těchto látek, a to buď blokadí periferní aminoskupiny nebo deprotonací fenolické hydroxy skupiny. Takto je možné připravit rozličné senzory pro kationty kovů<sup>4, 126, 127</sup> či indikaci pH.<sup>118, 128, 129</sup> Oktaamino substituované TPyzPzs, které díky vysoce účinnému ICT jsou schopny zhaset fluorescenci jiných molekul nezávisle na podmínkách okolního prostředí, jsou v naší skupině předmětem intenzivního výzkumu v oblasti zhasení fluorescence v ODN sondách, což je mj. téma předložené disertační práce.<sup>77, 130, 131</sup>

## 5 METODICKÁ ČÁST

### 5.1 Vazba TPyzPz na oligodeoxynukleotidový řetězec

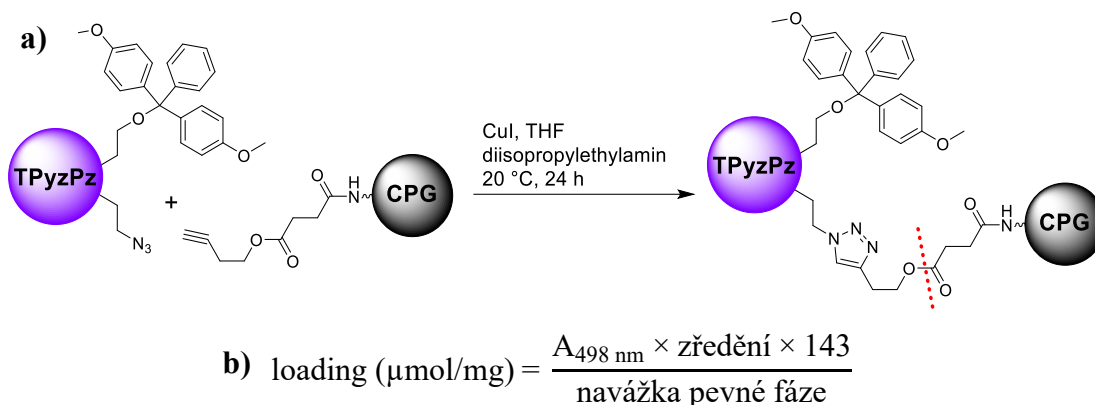
Pro syntézu samotného ODN řetězce se používá DNA syntetizátor, kde je vlákno postupně syntetizováno na pevné fázi od 3'-konce pomocí částečně chráněných deoxynukleosidů (Obr. 35).



**Obr. 35** Schéma jednoho cyklu v DNA syntetizéru: 1) detitylace hydroxy skupiny v pozici 5, 2) coupling volné hydroxy skupiny s fosforamiditem, 3) oxidace esteru kyseliny fosforité na ester kyseliny fosforečné, 4) vstup do dalšího cyklu, 5) tzv. „capping“ čili acetylace nezreagovaných hydroxylových skupin.

Samotná syntéza končí odštěpením ethylnitrilu z esteru kyseliny fosforečné a odštěpením ODN řetězce z pevné fáze. Po odštěpení z pevné fáze následuje čištění pomocí gelové chromatografie či vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, z angl. High-performance liquid chromatography).

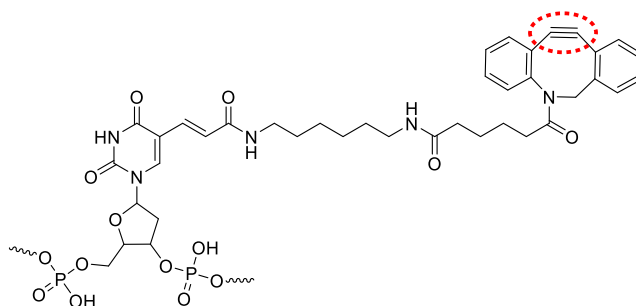
V případě ODN sond připravovaných v rámci této disertační práce bylo postupováno dle standardních procedur s drobnými obměnami. Syntéza sond značených pomocí TPyzPz začínala na pevné fázi (CPG, z angl. Controlled pore glass), která byla modifikována pomocí TPyzPz, kde samotné napojení TPyzPz na pevnou fázi probíhalo pomocí azido-alkynové Huisgenovy cykloadice (Obr. 36a).



**Obr. 36** a) reakce napojení TPyzPz na modifikovanou pevnou fázi (CPG), červeně naznačeno místo, kde dochází k uvolnění z CPG; b) rovnice pro výpočet loadingu na pevnou fázi.

Pro správné zvolení podmínek syntézy ODN řetězce bylo třeba znát množství funkčních skupin, na kterých může začít syntéza, což bylo určeno pomocí rovnice pro výpočet tzv. *loadingu* (Obr. 36b). Samotná syntéza ODN sondy pak probíhala u externí společnosti GENERI BIOTECH (Králové, Česká republika) v DNA/RNA syntetizátoru Applied Biosystems 394 (Perkin-Elmer, USA). Následné čištění sond jsem již prováděl na půdě Farmaceutické fakulty pod vedením doc. PharmDr. Radima Kučery, Ph.D. Prvním krokem čištění ODN sond bylo odstranění nízkomolekulárních nečistot pomocí gelové chromatografie na předplněných kolonkách CentriPure N10 (empBIOTECH, Německo). Finální čištění probíhalo semipreparativní HPLC na sestavě LC 20 A Prominence (Shimadzu, Japonsko) s DAD detektorem, kdy k detekci produktu sloužila absorbance ODN řetězce (při 260 nm), použitého fluoroforu a TPyzPz.

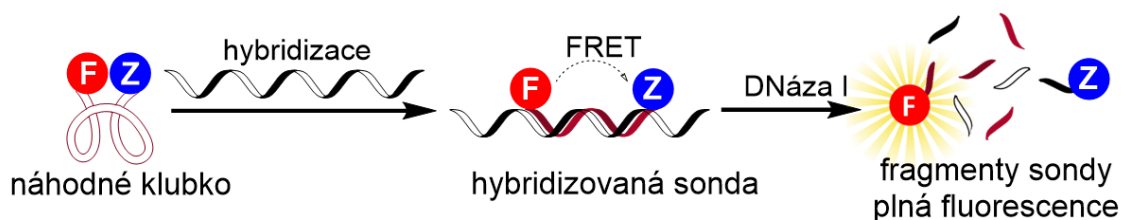
Další možností napojení TPyzPz nesoucího azidovou skupinu na ODN řetězec je využití click chemie na thymidin modifikovaný dibenzoazacyklooktynem (DBCO) (Obr. 37).



**Obr. 37** Thymidin modifikovaný pomocí DBCO – zvýrazněna trojná vazba, kde probíhá azido-alkynová Huisgenova cykloadice

## 5.2 Hodnocení účinnosti zhášení u připravených DNA sond

Jednotlivé sondy jsem hodnotil z hlediska účinnosti zhášení (QE, z angl. Quenching efficiency), což je důležitý parametr pro nové zhášeče fluorescence.<sup>12</sup> Pro tento účel jsem vyvinul zjednodušenou modelovou metodu PCR. Exonukleázová aktivita Taq-polymerázy byla simulována v tomto případě pomocí DNázy I (Obr. 38).<sup>77</sup>



Obr. 38 Schéma upraveného TaqMan® modelu PCR.

Roztok sondy byl vpraven do kyvety s 600  $\mu\text{l}$  hybridizačního pufru, tak aby výsledná koncentrace sondy v kyvetě byla 50 nM. Následovalo měření emisního spektra sondy (stav – náhodné klubko a statické zhášení) na přístroji FS5 Spectrofluorometer (Edinburgh Instruments, Velká Británie). Poté bylo do kyvety přidáno komplementární vlákno DNA, tak aby jeho výsledná koncentrace byla 250 nM, a kyveta byla zahřívána při 75 °C po dobu 10 minut. Roztok byl následně ponechán ve tmě 30 minut volně zchladnout. Znovu bylo změřeno emisní spektrum (stav – zhybridizovaná sonda a zhášení pomocí FRET). Posledním krokem bylo přidání 1  $\mu\text{l}$  DNázy I (1 U/1  $\mu\text{L}$ , Thermo Scientific, USA) a měření emisních spekter v 2 minutových intervalech (stav – pouze fragmenty ODN řetězce). Dvou minutové intervaly měření ukázaly kinetiku fragmentace ODN řetězce, která potvrdila dosažení fáze plateau. Výsledná účinnost zhášení byla vypočítána z následující rovnice (Rovnice 6):

$$QE = \left(1 - \frac{F_x}{F_{\max}}\right) \times 100 [\%]$$

*Rovnice 6* Rovnice pro výpočet QE: hodnota emisního maxima v daném bodu experimentu ( $F_x$ ), hodnota emisního maxima po kompletní fragmentaci ODN řetězce ( $F_{\max}$ ).

Použitelnost sond v reálných qPCR experimentech byla testována ve firmě GENERI BIOTECH na multiplikaci transportního genu SLCO2B1.<sup>132</sup>

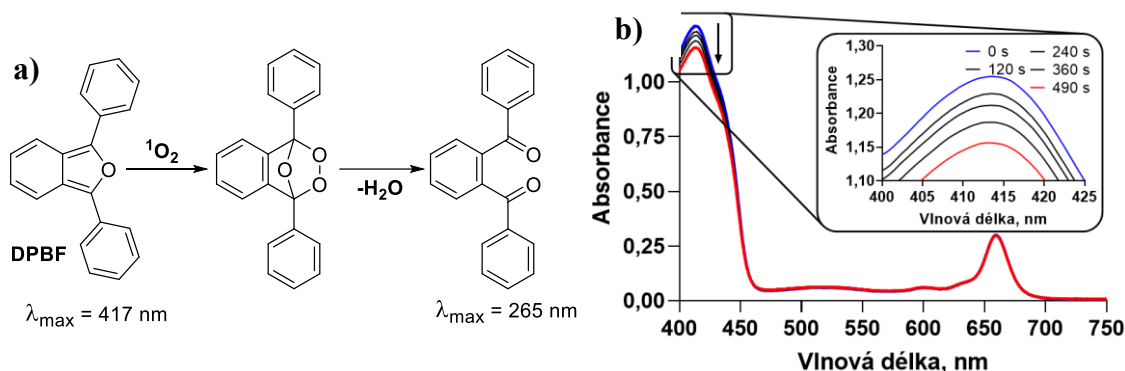
## 5.3 Popis vybraných fotofyzikálních vlastností

### 5.3.1 Kvantový výtěžek produkce singletového kyslíku ( $\Phi_\Delta$ )

Pro měření hodnot  $\Phi_\Delta$  jsou používány dvě metody – přímá a nepřímá. V přímé metodě je po ozáření vzorku sledována fosforescence produkovaného  $^1\text{O}_2$  při 1275 nm,

kteřá je poté porovnána s fosforencí  $^1\text{O}_2$  produkovaného referenční sloučeninou za stejných podmínek.<sup>133</sup>

V nepřímé metodě se sleduje vliv  $^1\text{O}_2$  na tzv. scavenger, což je molekula, která se působením  $^1\text{O}_2$  chemicky mění. Při studiu  $\Phi_\Delta$  u Pcs a TPyzPzs v organických rozpouštědlech je většinou používán jako scavenger 1,3-difenyloisobenzofuran (DPBF), u něhož dochází působením  $^1\text{O}_2$  k cykloadici a následnému rozštěpení furanového cyklu (Obr. 39a) a tím k poklesu absorbance molekuly v oblasti 417 nm. Podmínkou při měření  $\Phi_\Delta$  je zachování identických podmínek včetně použití stejného rozpouštědla (v mém případě tetrahydrofuran – THF, DMF, toluen) pro vzorek a referenční sloučeninu.



Obr. 39 a) rovnice rozkladu DPBF; b) pokles absorbance DPBF při 414 nm v závislosti na době iradiace.

Měření rozkladu DPBF se v naší skupině provádí na optické lavici, kde zdrojem světla je 100 W lampa (ozone-free xenonová lampa, 100 W, Newport). Světlo nejprve prochází přes vodní filtr pro odfiltrování infračerveného spektra, dále prochází cut-off filtrem OG530 (odfiltrování světla o vlnové délce nižší než 530 nm, které by mohlo nespecificky rozkládat DPBF). Předposledním prvkem v této optické soustavě je čočka, která fokusuje světelné paprsky do držáku, kde je upevněna kyveta se vzorkem. V držáku je i malá míchačka, která umožňuje míchání roztoku v kyvetě během měření. Celé měření probíhá za co největšího vyloučení externích zdrojů světla. Prvně je připraven zásobní roztok DPBF, tak aby absorbance DPBF byla okolo 1,0. Roztok DPBF (2,5 ml) je přenesen do kyvety, ve které je nasycen kyslíkem (1 min probublání), a je změřeno absorpční spektrum (tzv. blank) na přístroji UV-VIS Spectrophotometer UV-2600 (Shimadzu, Japonsko). Poté je do kyvety přidán vzorek (obvykle 20  $\mu\text{l}$  ze zásobního koncentrovaného roztoku), tak aby absorbance v Q pásu byla okolo 0,1, a je změřeno opět absorpční spektrum. Poté následuje iradiace vzorku světlem na optické lavici a změření absorpčního spektra. Tento krok se opakuje minimálně třikrát. Délka ozařování by měla odpovídat vždy snížení absorbance DPBF o 2-3 %. Maximální rozklad DPBF během

jednoho experimentu nesmí překročit 15 %, protože by kinetika rozkladu DPBF následně nemusela mít lineární trend. Změřené hodnoty absorbance v maximu DPBF (obvykle 417 nm) jsou zaznamenány a využity pro stanovení směrnice přímky ( $k$ ) závislosti přirozeného logaritmu poklesu absorbance na době ozáření. Tyto hodnoty jsou následně využity pro výpočet  $\Phi_{\Delta}$  dle rovnice (Rovnice 7a), kde celkové množství přijatého světla ( $I_{aT}$ ) je spočítáno na základě Beerovy rovnice (Rovnice 7b):<sup>134</sup>

$$\text{a) } \Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \frac{k^S I_{aT}^R}{k^R I_{aT}^S} \quad \text{b) } I_a = I_0(1 - e^{-2,3A})$$

*Rovnice 7 a)* rovnice použitá pro výpočet  $^1O_2$  – směrnice křivky závislosti  $\ln(A_0/A_t)$  na době ozáření ( $A_0$  a  $A_t$  jsou absorbance DPBF před a po ozáření) ( $k$ ), celkové množství přijatého světla ( $I_{aT}$ ) (horní indexy: „R“ pro referenční sloučeninu a „S“ pro vzorek) od 530 nm do 850 nm; *b)* rovnice pro výpočet množství přijatého světla – transmittance filtru při dané vlnové délce ( $I_0$ ) a absorbance vzorku při dané vlnové délce ( $A$ ).

Jako referenční sloučenina je tradičně používán nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin (ZnPc), který má  $\Phi_{\Delta}$  0,53 v THF,<sup>135</sup> 0,56 v DMF<sup>136</sup> a 0,58 v toluenu.<sup>137</sup> Výsledné hodnoty jsou vždy průměrem tří samostatných měření.

### 5.3.2 Kvantový výtěžek fluorescence ( $\Phi_F$ )

$\Phi_F$  u Pcs a TPyzPzs je měřen také pomocí porovnávací metody, kde jako referenční sloučenina slouží obvykle ZnPc ( $\Phi_F = 0,32$  v THF<sup>138</sup>). Principem metody je excitace roztoku referenční sloučeniny a roztoku vzorku světlem stejné vlnové délky a sledování plochy pod křivkou příslušného emisního spektra. Následně jsou hodnoty dosazeny do rovnice (Rovnice 8)<sup>134</sup> a je spočteno  $\Phi_F$ :

$$\Phi_F^S = \Phi_F^R \left( \frac{F^S}{F^R} \right) \left( \frac{1 - 10^{-A^R}}{1 - 10^{-A^S}} \right) \left( \frac{n^S}{n^R} \right)^2$$

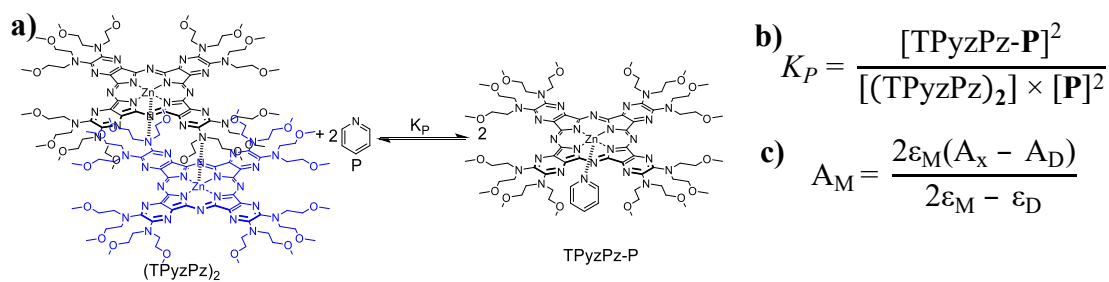
*Rovnice 8* Rovnice pro výpočet  $\Phi_F$  – plocha pod křivkou emisního spektra ( $F$ ), absorbance při excitační vlnové délce ( $A$ ), index lomu použitého rozpouštědla ( $n$ ) (horní indexy: referenční sloučenina ( $R$ ) a vzorek ( $S$ )).

Rozpouštědlo, ve kterém se provádí měření, má vliv na  $\Phi_F$ , ale tento vliv lze snadno korigovat indexem lomu použitých rozpouštědel. Lze proto při měření použít jiné rozpouštědlo pro vzorek a referenční sloučeninu. Výsledné hodnoty jsou opět průměrem tří samostatných měření.

## 5.4 **Hodnocení supramolekulárních agregátů**

Oktaamino substituované TPyzPzs mají tendenci agregovat do J-dimerů v závislosti na jejich koncentraci či použitém rozpouštědle. Pokud je použito nekoordinační rozpouštědlo (toluen, hexan), tak TPyzPz vytvářejí J-dimery, které je následně možné rozvolnit přidávkem koordinující sloučeniny (pyridin, *N*-methylimidazol).

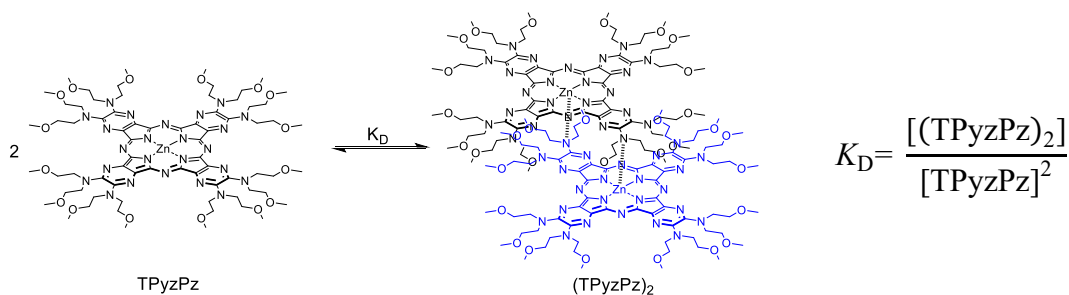
Tendence k tvorbě dimerů byla studována pomocí titrací, kdy k roztoku TPyzPz (1  $\mu\text{M}$  nebo 10  $\mu\text{M}$ ) v toluenu byl postupně přidáván pyridin až do maximální koncentrace (200 mM), čímž došlo k monomerizaci TPyzPz v roztoku. Po každém přidavku pyridinu byla měřena absorpční a emisní spektra. Excitace při měření emisních spekter byla volena v isobestickém bodě absorpčních spekter, aby nebylo nutno korigovat emisní spektra na množství dodané energie. Ze získaných dat byly vypočteny **rovnovážné konstanty** TPyzPzs nelineární regresí pomocí programu Prism 8 for Windows (GraphPad Software), a to na základě vztahů popsanych výzkumnými skupinami Kobukeho<sup>139</sup> a Torrese.<sup>97</sup> První konstantou byla rovnovážná konstanta  $K_P$ , která v sobě zahrnuje ochotu pyridinu koordinovat se na centrální zinečnatý kationt TPyzPz a zároveň sílu vzájemné vazby mezi dvěma TPyzPzs (Obr. 40a, b).  $K_P$  byla spočítána na základě závislosti tzv. normalizované absorbance  $A_M$  (Obr. 40c) na koncentraci pyridinu, kde  $A_D$  je absorbance v maximu odpovídajícímu dimeru (před začátkem titrace) a  $A_M$  je absorbance v Q pásu monomeru (na konci titrace pyridinem).



**Obr. 40** Výpočet monomerizační konstanty ( $K_P$ ). **a)** schéma rovnovážné reakce; **b)** rovnice rovnovážné reakce – koncentrace koordinovaného pyridinu na TPyzPz ( $[\text{TPyzPz-P}]$ ), koncentrace dimeru ( $[(\text{TPyzPz})_2]$ ), koncentrace pyridinu ( $[\text{P}]$ ); **c)** rovnice pro výpočet normalizované absorbance – extinkční koeficient ( $\varepsilon$ ), monomer ( $M$ ), dimer ( $D$ ), absorbance ( $A$ ), libovolný bod během titrace ( $x$ ).

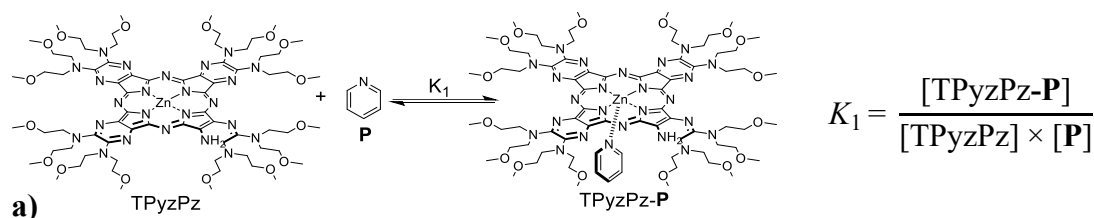
**Vliv koncentrace** na tvorbu J-dimerů byl sledován měřením absorpčních spekter roztoků vzorku v rozmezí koncentrací 100-0,1  $\mu\text{M}$  tak, že původní roztok byl vždy ředěn na polovinu (tj. 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$  atd). Roztoky v rozmezí koncentrací 100-12,5  $\mu\text{M}$  bylo nezbytné měřit v kyvetách s optickou dráhou 1 mm z důvodů vysoké absorbance převyšující možnosti detektoru spektrofotometru. Dimerizační konstanta ( $K_D$ ) (Obr. 41) byla následně spočtena nelineární regresí pomocí programu Prism 8 for Windows (GraphPad Software) ze závislosti absorbance monomerní složky TPyzPz na celkové koncentraci roztoku TPyzPz.





Obr. 41 Schéma a rovnice dimerizační konstanty.

Asociační konstanta  $K_I$  (definice viz Obr. 42a), která charakterizuje sílu vazby pyridinu na centrální kation kovu byla spočtena z jednoduchého vztahu mezi  $K_D$  a  $K_P$ , který jsme získali na základě dosazení jednotlivých rovnic pro  $K_P$  a  $K_D$  do sebe. Toto odvození je popsáno na Obr. 42b.



$$\text{b) } K_P = \frac{[\text{TPyzPz-P}]^2}{[(\text{TPyzPz})_2] \times [\text{P}]^2} \quad K_D = \frac{[(\text{TPyzPz})_2]}{[\text{TPyzPz}]^2} \quad K_I = \frac{[\text{TPyzPz-P}]}{[\text{TPyzPz}] \times [\text{P}]}$$

$$K_D = \frac{[(\text{TPyzPz})_2]}{[\text{TPyzPz}]^2} = \frac{\frac{[\text{TPyzPz-P}]^2}{K_P [\text{P}]^2}}{\left(\frac{[\text{TPyzPz-P}]}{K_I \times [\text{P}]}\right)^2} = \frac{K_I^2}{K_P}$$

$K_I = \sqrt{K_D \times K_P}$

Obr. 42 a) schéma a rovnice asociační konstanty; b) úprava rovnic nutná pro výpočet asociační konstanty  $K_I$ .

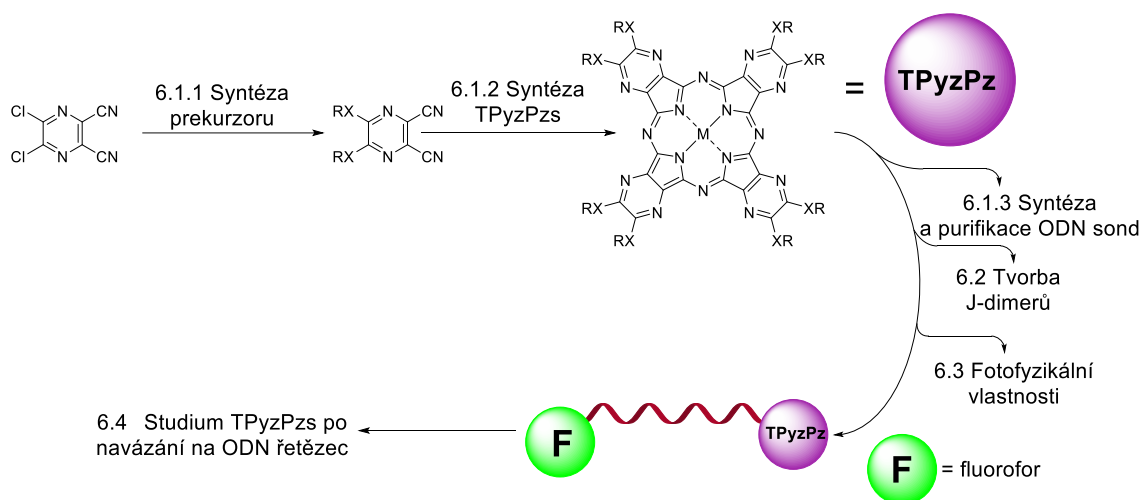
**Vliv teploty** na stálost J-dimerů byl sledován v rozmezí 20–100 °C pomocí měření transmittance roztoku v temperovaném držáku kyvet (FS5 Spectrofluorometer, Edinburgh Instruments, Velká Británie). Získaná spektra byla převedena na absorpční podle vztahu  $A = -\log T$ , kde A je absorbance a T je transmittance. Vyhodnocení probíhalo na základě sledování nárůstu Q-pásmu monomerní formy TPyzPz.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Během svého postgraduálního studia jsem se zabýval převážně syntézou oktaalkylamino substituovaných TPyzPzs využívaných jako zřášeče fluorescence a zkoumáním jejich vlastností. Výsledky mé laboratorní práce byly sepsány do tří publikací, kde jsem jako první autor. Tyto publikace budou pro přehlednost citovány jako přílohy **P1–P3**. Dále jsem se podílel jako spoluautor na dvou dalších publikacích během svého postgraduálního studia – jedné na téma senzorických molekul<sup>128</sup> a druhé na téma PDT.<sup>140</sup> Tyto publikace nesouvisí s tématem mé disertační práce, nebudou proto detailněji popisovány a jsou citovány klasickým způsobem. Další dvě práce<sup>3, 141</sup> z oblasti PDT, kde jsem jako spoluautor, vycházely z náplně mé diplomové práce a jsou citovány v textu opět klasickým způsobem.

Určité části mých prací **P1–P3** se prolínají, takže diskuse výsledků bude z části společná a poté budou samostatně diskutovány obsahy jednotlivých článků. Číslování připravených molekul je zvoleno tak, aby TPyzPzs měly co nejnižší čísla.

Cesta jednotlivých experimentů je naznačena na obrázku níže (Obr. 43), kde je schematicky znázorněno, co bylo možno v jakém kroku testovat.



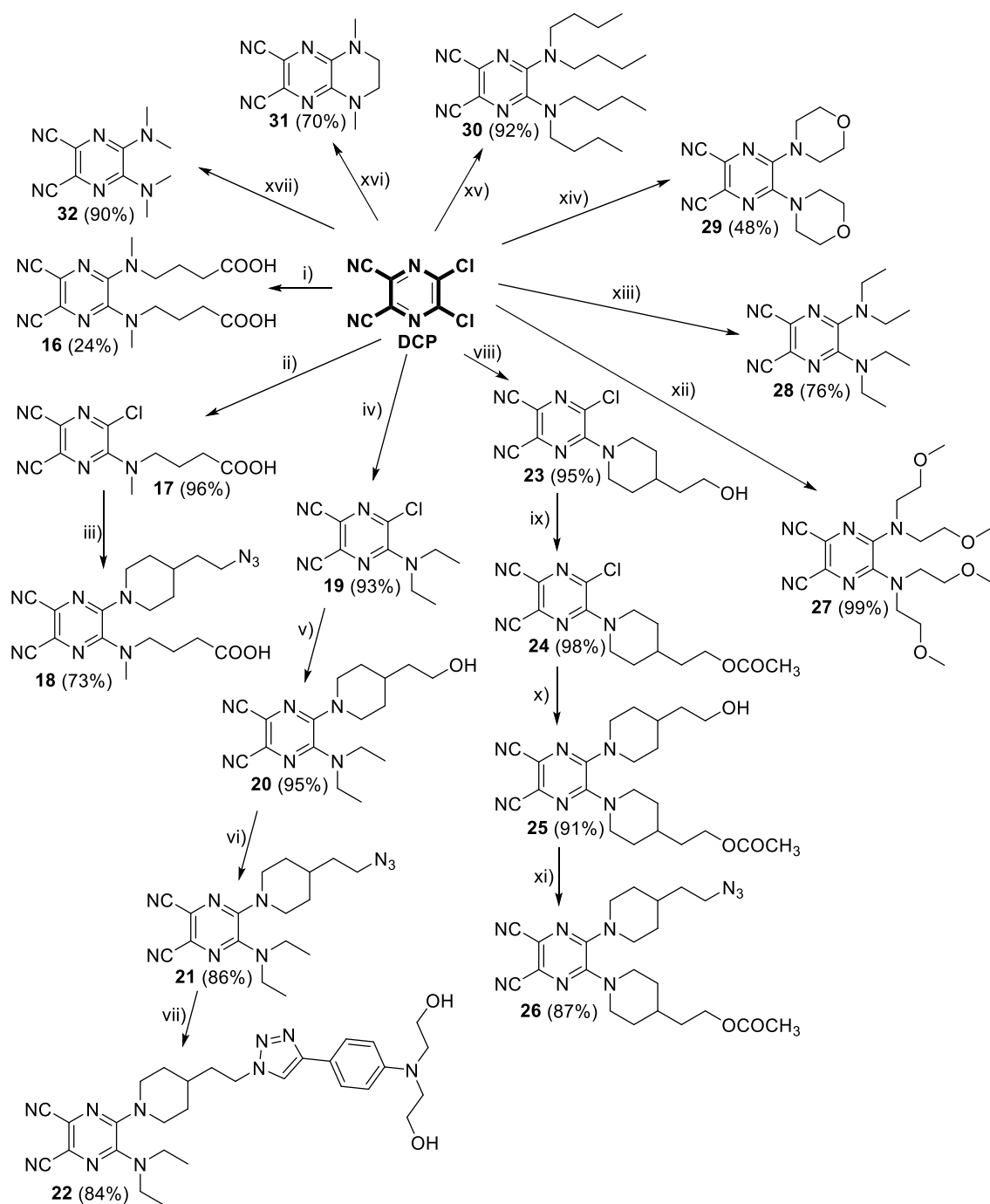
Obr. 43 Zjednodušené schéma jednotlivých kroků v experimentální části disertační práce.

## 6.1 Syntéza zamýšlených látek

Jednotlivé kroky syntézy cílových struktur budou popsány v následujících kapitolách – jedná se o popis především použitých postupů při řešení této práce a v některých případech budou zmíněny i alternativy k použitým metodám.

### 6.1.1 Syntéza prekurzorů

Syntéza prekurzorů vycházela z komerčně dostupného 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (DCP), který byl v elektron-deficitních polohách 5 a 6 periferně modifikován pomocí nukleofilní substituce (Obr. 44). Aromatická nukleofilní substituce byla na DCP výrazně usnadněna díky zápornému mezomernímu efektu karbonitrilových skupin, a dále pak i díky záporným indukčním efektům pyrazinových dusíků a chloro substituentů. Pro posunutí rovnováhy reakce směrem k produktům byla nezbytná přítomnost báze, která mimo jiné vychytávala vzniklé chloridové ionty odstupující z DCP. Jako báze obvykle sloužil přebytek sekundárního aminu, který byl použit pro samotnou nukleofilní substituci (obvykle 6 ekvivalentů, pokud měl být požadovaný produkt disubstituovaný). Bohužel ne vždy byla možnost použít nadbytku sekundárního aminu např. z důvodu jeho vysoké ceny či nesnadné syntetické dostupnosti. V takovémto případě bylo nutné použít nenukleofilní organickou bázi (triethylamin) nebo anorganickou bázi ( $K_2CO_3$ ). Pro mono-substituci DCP jen do prvního stupně bylo nezbytné použít pouze 2 ekvivalenty sekundárního aminu (nebo 1 ekvivalent aminu a 1 ekvivalent báze) a reakční směs chladit.

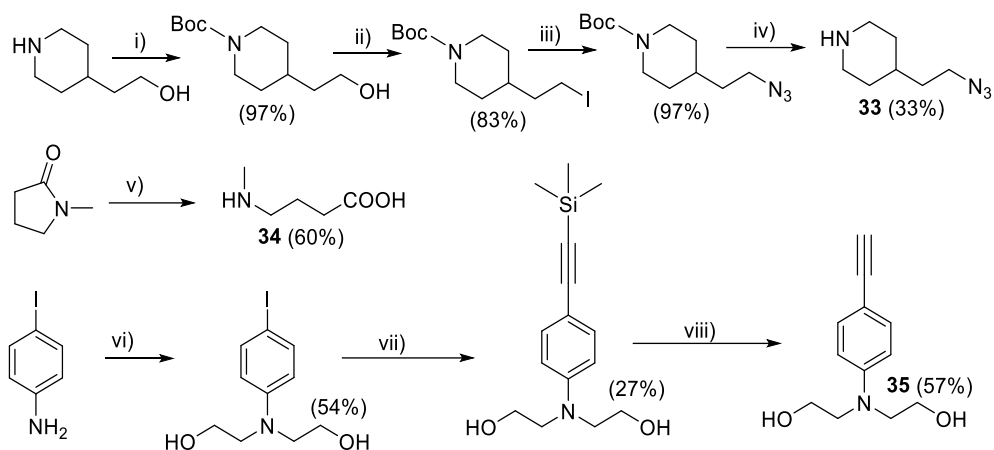


**Obr. 44** Schéma syntézy prekurzorů pro práce P1–P3. i) slouč. 34, TEA, NMP, laboratorní teplota, 48 h; ii) slouč. 34, THF, laboratorní teplota, 3 dny; iii) slouč. 33, THF, 66 °C, 24 h; iv) *N,N*-diethylamin, THF, -12 °C, 20 min; v) 2-(piperidin-4-yl)ethan-1-ol, THF, laboratorní teplota, 90 min; vi) 1. MsCl, TEA, bezv. DCM, 20 °C, 1 h; 2. NaN<sub>3</sub>, anh. DMF, 60 °C, 90 min; vii) slouč. 35 CuI, DIPEA, anh. DMF, argon, 153 °C, 15 h; viii) 2-(piperidin-4-yl)ethan-1-ol, THF, 0 °C; ix) AcCl, AcONa, THF, 20 °C; x) 2-(piperidin-4-yl)ethan-1-ol, THF, 20 °C; xi) 1. DCM, DIPEA, MsCl, 20 °C, 1 h; 2. DMF, NaN<sub>3</sub>, 60 °C, 90 min; xii) bis(2-methoxy)ethylamin, THF, 66 °C, 5 h; xiii) *N,N*-diethylamin, THF, 66 °C, 6 h; xiv) morfolin, THF, 20 °C, 1 h; xv) *N,N*-dibutylamin, THF, 66 °C, 1,5 h; xvi) *N,N,N'*-trimethylethylendiamin, THF, 66 °C, 2,5 h; xvii) *N,N*-dimethyamin v ethanolu (33%), THF, 20 °C, 1,5 h.

Příprava téměř všech symetricky 5,6-disubstituovaných prekurzorů probíhala bez větších potíží s výtěžky převyšujícími 75 %. Jediná syntéza prekurzoru 16 dosahovala maximálně 24 % nejspíše z důvodu horší rozpustnosti *N*-methyl-4-aminobutanové kyseliny v reakčním rozpouštědle. Daná reakce byla prováděna i za zvýšené teploty, což vedlo

k velkému množství vedlejších produktů. Zároveň byla vyzkoušena reakce v THF, které se používá jako běžné rozpouštědlo při tomto typu reakcí, ale výsledný výtěžek dosahoval pouze 8 %. Velice zajímavá byla syntéza prekurzoru **31**, kde došlo během reakce k eliminaci jedné methylové skupiny na substituentu a k tvorbě částečně nenasyceného 6-ti členného cyklu, podobně jako bylo pozorováno v minulosti naší skupinou.<sup>142</sup> Důležitým krokem bylo zefektivnění přípravy prekurzoru **26**, která probíhala čtyř stupňovou syntézou z DCP a výtěžek dosahoval 74 % za všechny 4 kroky syntézy. Prvním krokem bylo zjištění nejvhodnějšího acetylačního činidla pro blokaci hydroxylové skupiny na sloučenině **23**, kdy byly zkoušeny anhydrid kyseliny octové, anhydrid kyseliny octové s katalytickým množstvím kyseliny sírové, anhydrid kyseliny octové s octanem sodným a jako poslední činidlo byl zkoušen chlorid kyseliny octové, který se ukázal jako nejvýhodnější. Druhým důležitým faktorem kaskády reakcí bylo zavedení azidu na místo hydroxylové skupiny sloučeniny **25**. Při původní reakční teplotě 90 °C vznikalo velké množství vedlejších produktů (nejspíše tetrazolů reakcí azidu sodného s nitrilovými skupinami), ale po snížení teploty na 60 °C probíhala konverze mesylátu z 87 %.

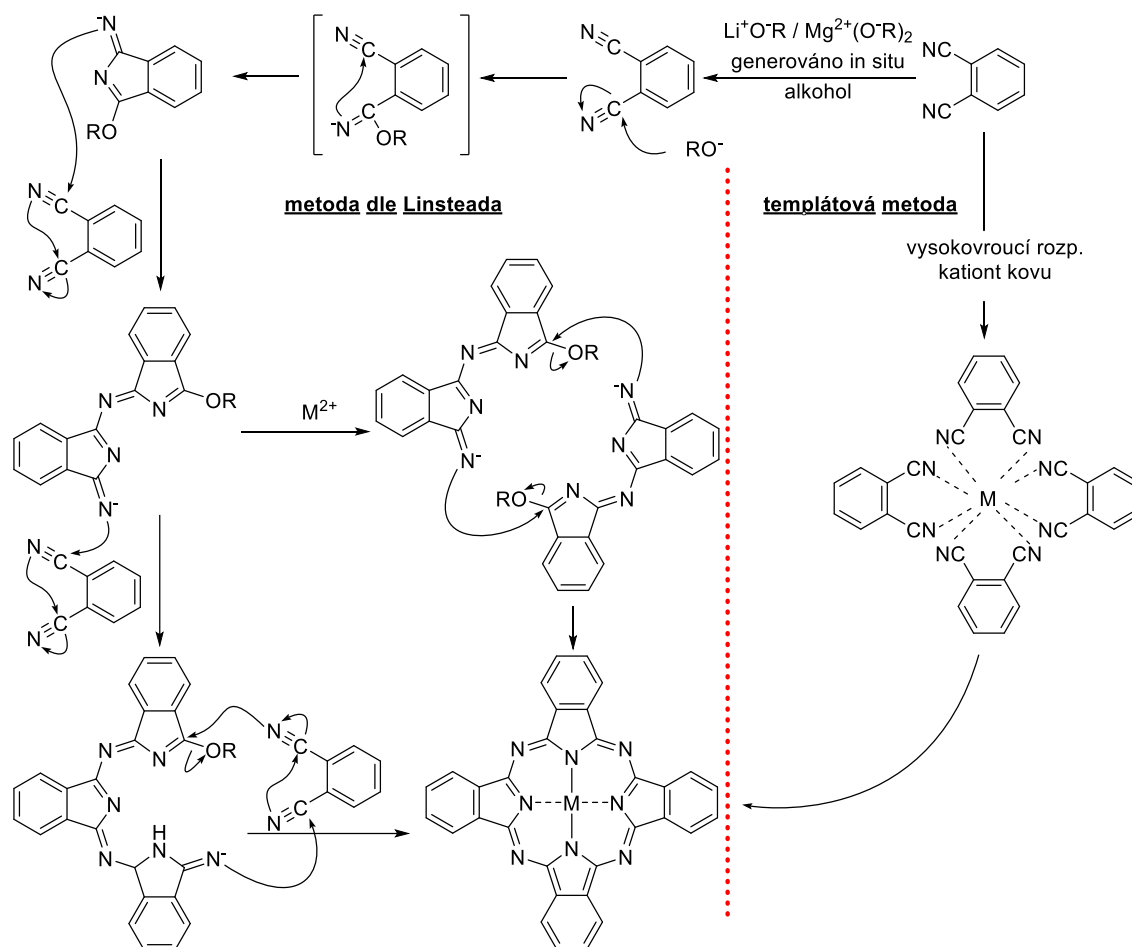
Aminy sloužící jako nukleofily pro přípravu prekurzorů byly v mnoha případech komerčně dostupné, nicméně některé z nich bylo nutno připravit dle publikovaných postupů (Obr. 45).<sup>143-145</sup> Amin **33** jsme původně zamýšleli používat jako univerzální molekulu pro zavedení azidu na prekurzor v jednom kroku, ale díky vysokému výtěžku konverze prekurzorů **20** na **21** (86 %) a **24** na **25** (87 %) se postup přes amin **33** ukázal jako méně výhodný. Syntéza meziprojektu **35**, který byl následně připojen k **21** pomocí azido-alkynové Huisgenovy cykloadice, byla náročná z důvodu nestability produktu na světle, tudíž bylo nezbytně nutné po přečištění sloupcovou chromatografií alkyln **35** okamžitě navázat na molekulu **21** za vzniku stabilního produktu **22**.



**Obr. 45** Syntetické postupy pro syntézu periferních substituentů. i)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ , DCM, 20 °C, 4 h; ii)  $\text{Ph}_3\text{P}$ ,  $\text{I}_2$ , pyridin, toluen, 80 °C, 3 h; iii)  $\text{NaN}_3$ , DMSO, 20 °C, 60 h; iv) TFA, DCM, 20 °C, 3 h; v)  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , voda, 100 °C, 4 h; vi) 2-chlorethanol,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , Ar, 55 °C, 10 h; vii) (trimethylsilyl)acetylen,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ , CuI, TEA, dioxan, argon, 50-55 °C, 14 h; viii)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, 20 °C, 1 h.

### 6.1.2 Syntéza TPyzPzs

Pro přípravu Pcs a příbuzných makrocyklů se běžně používají dvě základní metody cyklotetramerizačních reakcí prekurzorů. První možností je tzv. **templátová metoda**, kdy jsou prekurzory zahřívány ve vysoko vroucím rozpouštědle (DMF, chinolin či lze provádět v tavenině) s příslušnou solí, kde kationt kovu funguje jako středobod, okolo kterého se uspořádají 4 prekurzory a díky tomu se karbonitrilové skupiny dostanou tak blízko sebe, že reagují za vzniku konečného makrocyklu (Obr. 46). Druhou metodou je **metoda postupné výstavby kruhu** (tzv. **Linsteadova metoda**), která je zahájena atakem karbonitrolové skupiny pomocí alkoholátu. V naší laboratoři se pro syntézu alkylaminových TPyzPz osvědčila Linsteadova metoda v bezvodém butanolátu lithném nebo hořečnatém. Pokud je použit butanolát lithný, tak vzniká bezkovový derivát TPyzPz, protože lithné ionty jsou koordinovány v centru makrocyklu velice slabě a jejich odstranění probíhá i při pouhém kontaktu s vodou. Při použití butanolátu hořečnatého vznikají hořečnaté komplexy TPyzPzs, které je většinou nutné převést na bezkovové deriváty z důvodu snadnější purifikace sloupcovou chromatografií, kterou se odseparují vzniklé kongenery, a pak následně opět inkorporovat kationt kovu, a to i v případě, že je záměrem připravit hořečnatý makrocyklus. Jestli zvolit alkoholát hořečnatý nebo lithný záleží na periferní substituci makrocyklu, protože alkoholát lithný je mnohem agresivnější, např. při použití alkylsulfanylové substituce prekurzorů dochází k nahrazení alkylsulfanových skupin alkoxyly.<sup>141</sup>

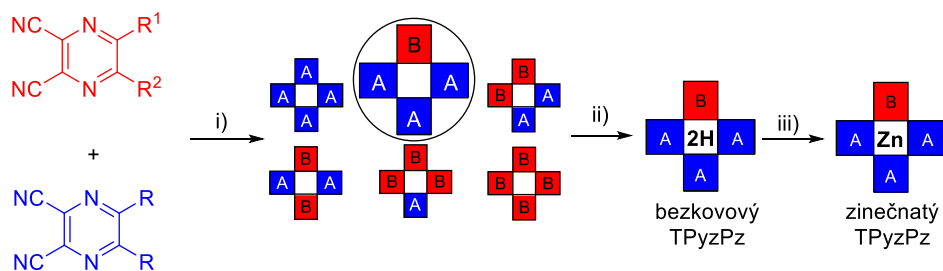


Obr. 46 Dva možné mechanismy cyklotetramerizační reakce.

Při syntéze nesymetrického TPyzPz vstupují do reakce prekurzory A a B. Výsledkem je statistická směs 6-ti kongenerů složených z různě nakombinovaných podjednotek A a B (AAAA, AAAB, ABAB atd.). Pokud je cílovým produktem kongener typu AAAB, používá se obvykle poměru výchozích prekurzorů 3:1. Po prvotní makrocyclizační reakci jsou separovány jednotlivé bezkovové kongenery TPyzPz pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu, což není vždy jednoduchá činnost. Separace bezkovových kongenerů je výhodnější než separace TPyzPzs s centrálním kationtem kovu, protože u bezkovových derivátů nedochází obvykle k chvostování na silikagelu. Posledním krokem je chelatace požadovaného kationtu kovu do centra TPyzPz, což se běžně provádí v prostředí vroucího pyridinu a soli kationtu kovu (octan zinečnatý, octan hořečnatý).

TPyzPzs, které jsem připravoval v rámci své disertační práce (Obr. 48), byly vždy připraveny metodou postupné výstavby kruhu, kdy jako iniciátor reakce sloužil butanolát lithný. Do centra izolovaných bezkovových derivátů TPyzPzs byl inkorporován

zinečnatý kationt, aby bylo zabráněno neřízené chelataci rozličných kationtů kovů během syntézy ODN vlákna (Obr. 47).

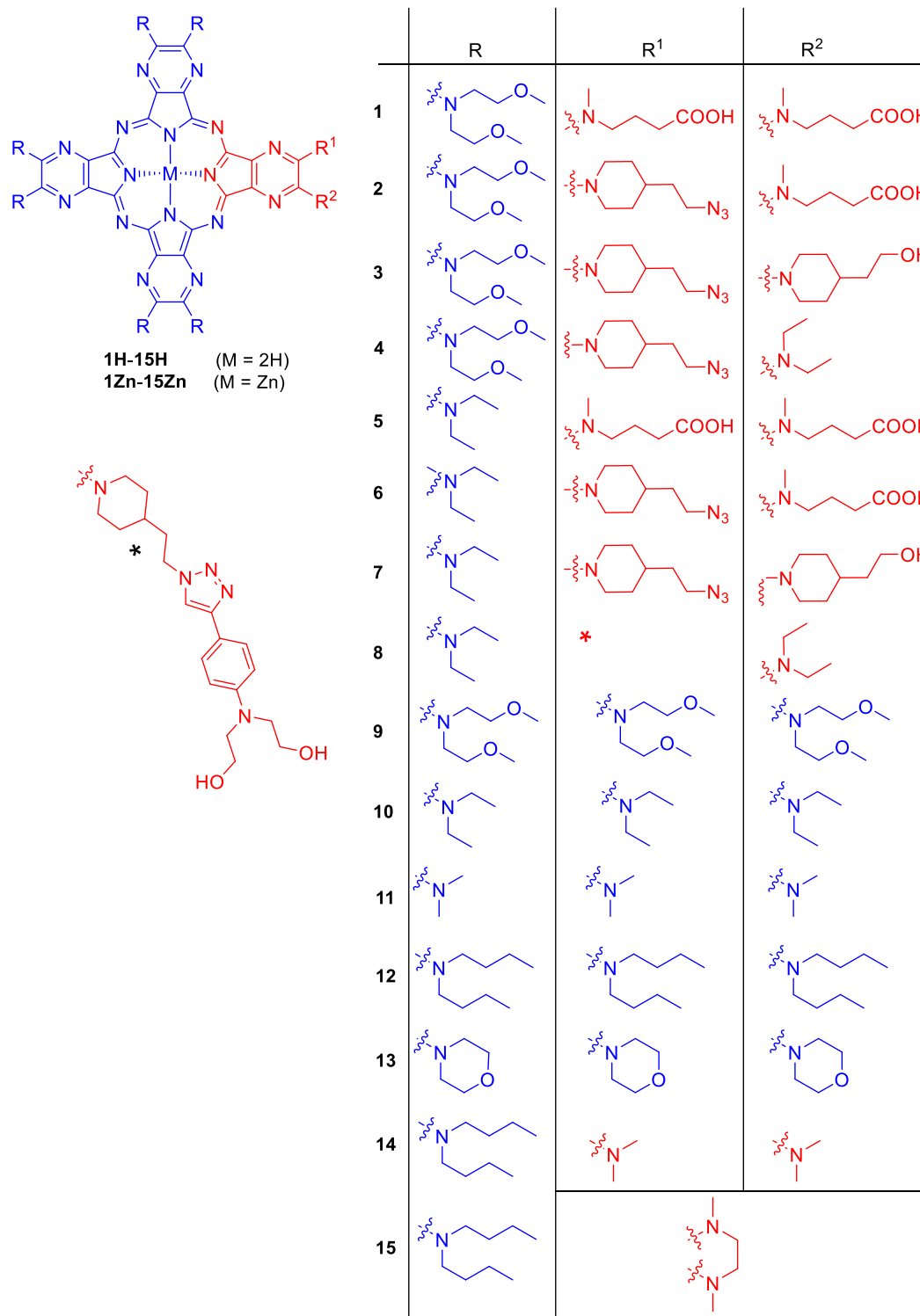


**Obr. 47** Obecný postup přípravy TPyzPzs. i) Li, BuOH, 118 °C, 30 min, ii) separace sloupcovou chromatografií na silikagelu; iii) Zn(OAc)<sub>2</sub>, pyridin, 115 °C, 3 h.

Cyklotetramerizační reakce se zprvu prováděla v prostředí butanolátu lithného ve vroucím butanolu po dobu 3 hodin, což byl již dříve používaný postup,<sup>130, 142</sup> ale během syntézy sloučeniny **4H** byl zaznamenán velice malý výtěžek 2-4%. Proto byla reakce opakována a každých 10 minut byl průběh monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC, z angl. Thin layer chromatography). TLC odhalilo, že reakční čas delší než 30 minut vede ke vzniku velkého množství polárních nečistot, a proto následně nepřesahoval čas cyklotetramerizační reakce 30 minut, čímž byl například zvýšen výtěžek syntézy sloučeniny **4H** na 15 %.

Při syntéze nesymetrických TPyzPzs **3H2** a **7H2** docházelo během cyklizace k ochránění hydroxy skupiny na prekurzoru **25**. Odstranění acetylu je důsledkem transesterifikace butanolátem lithným. Podobný jev byl pozorován i v literatuře.<sup>146, 147</sup> Nutno dodat, že se jedná o žádoucí proces, neboť tato hydroxy skupina mohla být posléze rovnou modifikována pomocí dimethoxytritylu z důvodu použití molekuly při syntéze ODN řetězce (viz dále).

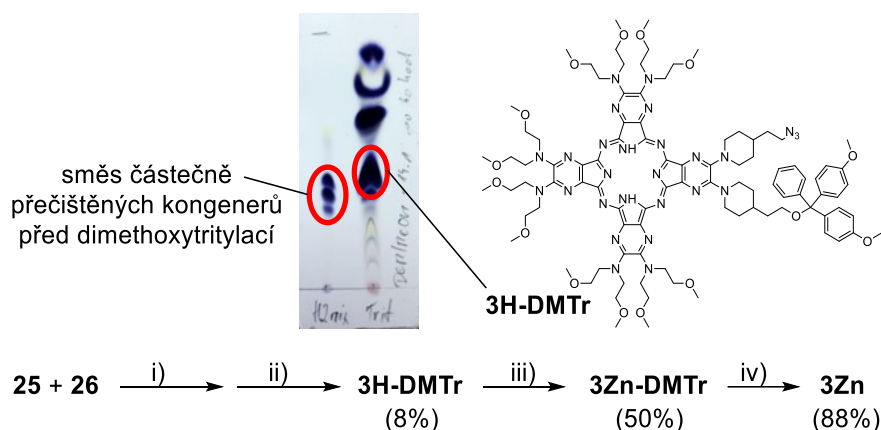




Obr. 48 TPzPzs připraveny v rámci této disertační práce.

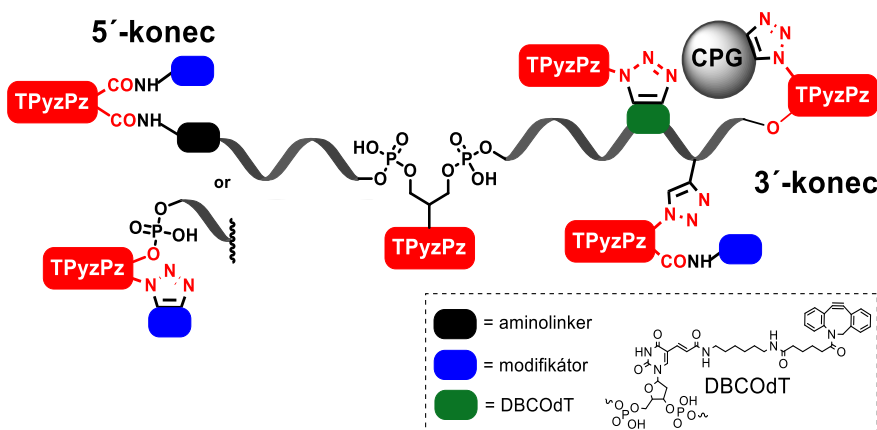
Během syntézy TPzPz **3H** nastal problém s chromatografickou separací požadovaného kongeneru AAAB, protože všechny kongenery ve statistické směsi vykazovaly podobné retenční faktory ve všech testovaných mobilních fázích a docházelo tak k eluci většiny kongenerů společně. Tento problém byl vyřešen zavedením dimethoxytritylové skupiny na volnou hydroxylovou skupinu ochráněnou během

cyklizace prekurzoru **25** pomocí reakce částečně přečištěné směsi kongenerů s dimethoxytrityl chloridem. Změnou lipofility jednotlivých kongenerů jsme byli schopni odseparovat a vyčistit požadovaný kongener **3H-DMTr** (Obr. 49) a následně ho převést na zinečnatý TPyzPz **3Zn-DMTr**. Odchránění hydroxy skupiny od dimethoxytritylu bylo provedeno pouze u malé části vzorku, aby bylo možné provést analýzy sloučeniny a fotofyzikální měření. Většina vzorku však zůstala v chráněné formě s dimethoxytritylem, protože takto je to výhodné pro syntézu ODN na pevné fázi.



**Obr. 49** Periferní modifikace pro změnu lipofility kongenerů. i) 1. Li, BuOH, 118 °C, 30 min; 2. DMTrCl, DMAP, bezvodý, pyridin, 20 °C, 48 h, ii) separace sloupcovou chromatografií na silikagelu; iii) Zn(OAc)<sub>2</sub>, pyridin, 115 °C, 3 h; iv) trichloroctová kyselina, DCM, 20 °C, 2 h, 88 %.

Zaměříme-li se na typy funkčních skupin vhodných pro vazbu na ODN, připravil jsem během svého postgraduálního studia TPyzPzs nesoucí karboxylovou skupinu, azid či hydroxy skupinu. Podrobně jsem se přípravou nesymetrických TPyzPz vhodných pro vazbu do libovolného místa ODN zabýval ve své práci **P3**. V rámci zmíněného projektu jsem připravil a charakterizoval TPyzPz, které by v budoucnu mohly být navázány na 5' - či 3' -konec nebo doprostřed ODN. Pro vazbu na 5' -konec je možné modifikovat hydroxy skupinu TPyzPz pomocí 2-kyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorfosforamiditu a následně využít standardní fosforamiditovou syntézu. Pro vazbu do středu je možno využít dvě hydroxylové skupiny na periferii TPyzPz, kdy se jedna modifikuje pomocí 2-kyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorfosforamiditu a druhá pomocí dimethoxytrityl chloridu. Vazba na 3' -konec využívá modifikace pevné fáze pomocí TPyzPz s volnou hydroxylovou skupinou. Schematicky jsou tyto možnosti zobrazeny na Obr. 50. Kromě vazby vlastního zhášedce na ODN je možno na připravené TPyzPz navázat i tzv. modifikátory, které mohou pozitivně ovlivňovat pevnost vazby sondy k antisense vlákně.



Obr. 50 Schématické znázornění teoretických možností vazby TPyzPzs na ODN řetězec.

### 6.1.3 Syntéza a purifikace ODN sond

Obecné postupy napojení TPyzPz na ODN byly popsány v kapitole 5.1. V případě napojení zhášeče na 3'-konci probíhala syntéza standardně na modifikovaném CPG ve směru 3'-5' a ukončena byla modifikací 5'-konce navázáním fluoroforu fosforamiditovou chemií. Pokud byl TPyzPz vázán do středu ODN řetězce, tak během syntézy byl inkorporovaný thymidin modifikovaný pomocí DBCO, na který jsme navázali příslušný TPyzPz zhášeč pomocí „click“ chemie. Posledním krokem bylo vždy uvolnění ODN řetězce z pevné fáze pomocí 32% roztoku amoniaku (v případě značení pomocí 6-karboxyfluorescein fosforamiditu (FAM), TPyzPz, BBQ-650<sup>®</sup>), roztoku K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v MeOH (pro CAL Fluor Red 610 – CFR610) nebo methoxyethylaminu v MeOH (pro Cy5).

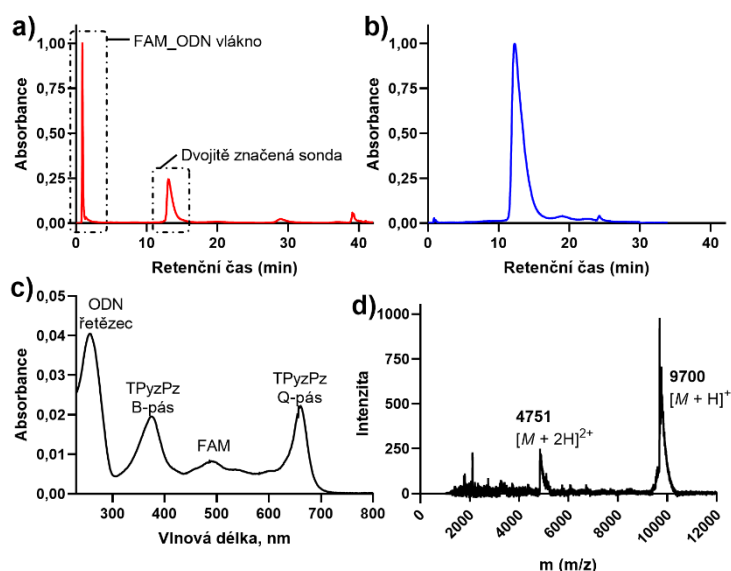
Roztok sondy po uvolnění z pevné fáze bylo nejprve nutné zbavit nízkomolekulárních nečistot gelovou chromatografií na kolonkách CentriPure N10. Požadované frakce byly odpařeny a následně naředěny destilovanou vodou na koncentraci 1 mM dle absorbance při 260 nm. Dalším krokem bylo využití semipreparativního HPLC pro purifikaci sondy.

Pro isokratickou HPLC purifikaci byla jako mobilní fáze použita směs acetonitrilu (ACN) s triethylamonium-acetátovým pufrům, kde se vzájemný poměr upravoval dle čištěné sondy. Jako stacionární fáze sloužily C18 reverzní kolony (Tabulka 2).

Tabulka 2 Specifikace HPLC systému.

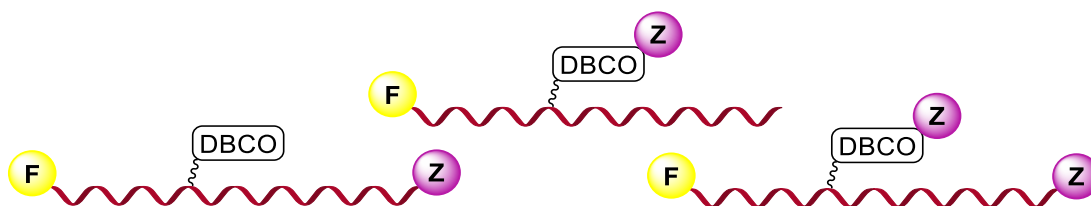
|                       | Sestava A  | Sestava B  |
|-----------------------|--|--|
| <b>kolona</b>         | Hypersil GOLD C18<br>150×10 mm<br>velikost částic – 5 μm | Hypersil BDS C18<br>100 × 4.6 mm<br>velikost částic 2,4 μm |
| <b>Teplota kolony</b> | 40 °C  |  |
| <b>Průtok</b>         | 2,5 ml/min   | 1,0 ml/min   |

Správné frakce byly sbírány na základě údajů z DAD detektoru. V momentu, kdy bylo detekováno požadované absorpční spektrum, byl zvýšen podíl ACN o 1–2 %, aby se urychlila eluce a snížil se tak objem sbíraných frakcí. Na Obr. 51 je možné porovnat chromatogram před a po purifikaci.



Obr. 51 HPLC záznam z čištění dvojitě značené sondy FAM-ODN-3Zn z práce P2. a) chromatogram po CentriPURE N10; b) chromatogram po purifikaci na HPLC (čistota – 95 %); c) absorpční spektrum piku dvojitě značené sondy; d) MALDI hmotnostní spektrum přečištěné sondy

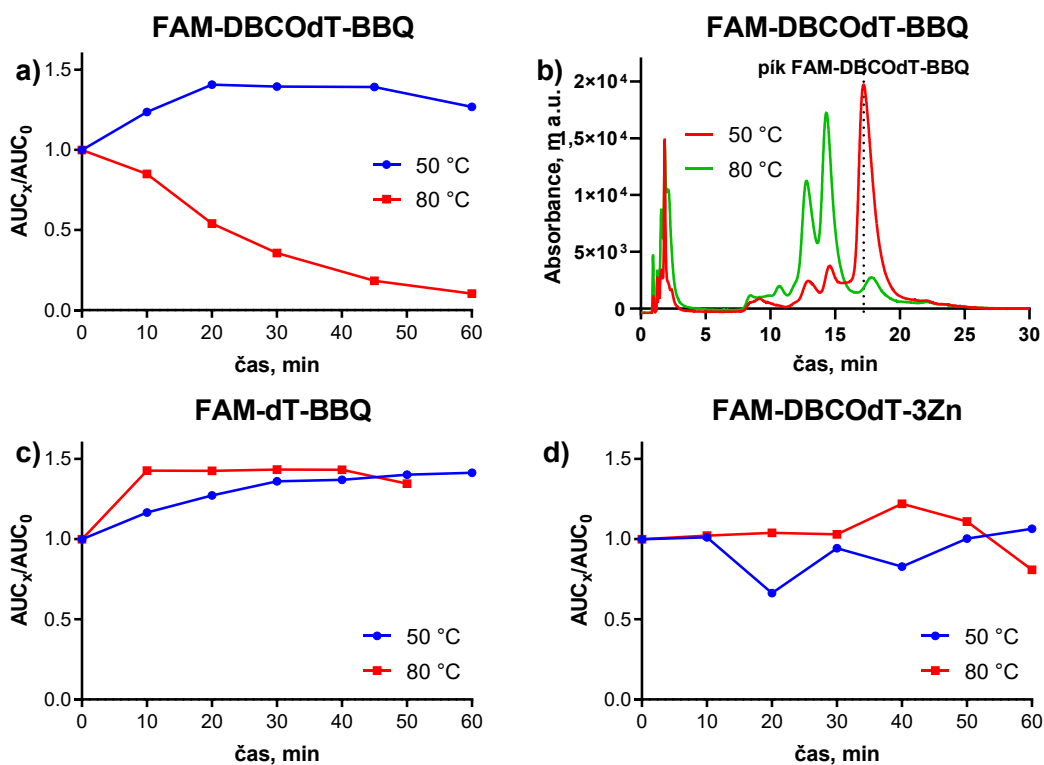
Pro zatím nepublikovaný projekt zabývající se dlouhými ODN sondami, které jsou značeny na 5'-konci pomocí FAM a poté ve svém středu či na 3'-konci značeny pomocí zhášeče, byly připraveny dvojitě a trojitě značené sondy (Obr. 52).



Obr. 52 Design dlouhých sond s jedním nebo dvěma zhášeči.

Pokud v případě sond s TPyzPz byl zhášeč přítomen na 3'-konci, tak syntéza začínala standardně na modifikované pevné fázi, a pokud byl TPyzPz umístován do

středu řetězce, tak jeho vazba zde probíhala pomocí azido-alkynové Huisgenovy cykloadice mezi trojnou vazbou DBCO a azidem na TPyzPz. Během čištění sond, značených TPyzPz nebylo zaznamenáno žádné nestandardní chování. Pro porovnání účinnosti zhášení bylo zamýšleno připravit tytéž sondy s tím rozdílem, že jako zhášeč bude BBQ-650<sup>®</sup> namísto TPyzPz. Čištění trojitě značené sondy a sondy s BBQ-650<sup>®</sup> uprostřed proběhlo bez problému. V případě sondy značené BBQ-650<sup>®</sup> na 3'-konci a volným DBCO uprostřed proběhla separace bez problémů, ale po zakoncentrování sondy na rotační vakuové odparce při 40 °C ukázal nový analytický nástřik přítomnost většího množství nečistot, než před separací. Nakonec byl udělán stabilitní test této sondy (Obr. 53a, b), kde se ukázalo, že daná ODN sonda je nestabilní za zvýšené teploty, tudíž jí nelze použít ani pro PCR. Pro ověření stability dalších sond v této sérii byly testovány i další dvě sondy **FAM-dT-BBQ**, kde DBCOdT je nahrazen klasickým thymidinem, a **FAM-DBCOdT-3Zn**, kde je namísto BBQ-650<sup>®</sup> použit TPyzPz zhášeč (Obr. 53c, d). Tyto sondy se ukázaly jako stabilní. Z výsledků vyplynulo, že kombinace volného DBCO a BBQ-650<sup>®</sup> vede k nespecifikované nestabilitě dané sondy.

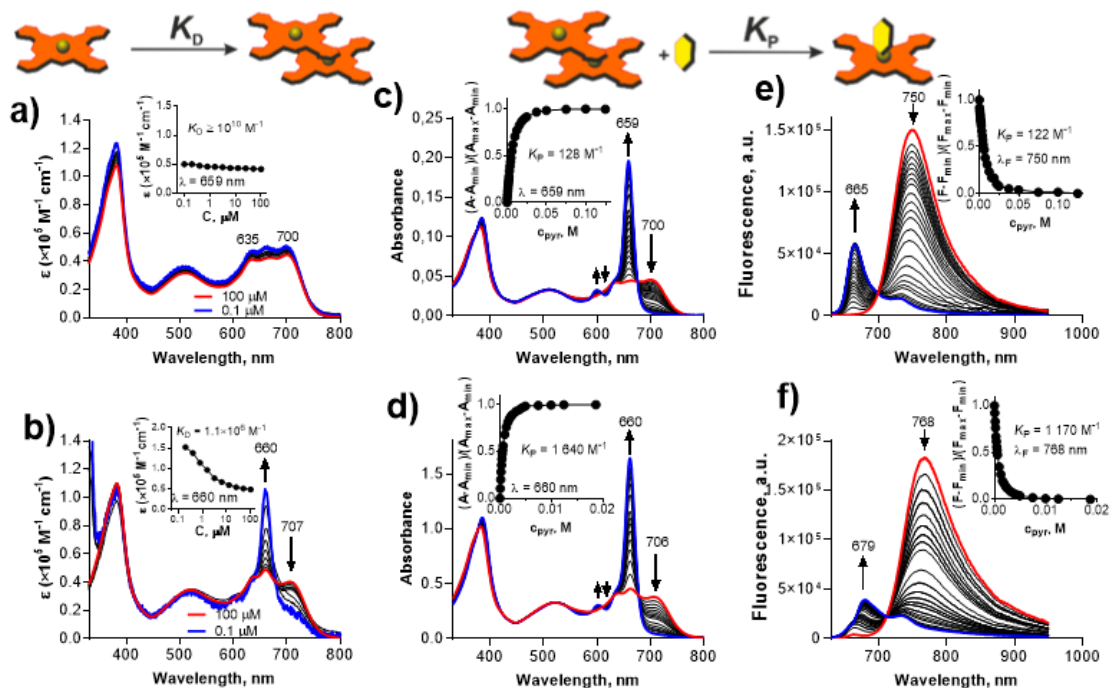


**Obr. 53** Teplotně stabilitní test sondy **FAM-DBCOdT-BBQ** – **a)** závislost  $AUC$  na době zahřívání roztoku sondy, **b)** chromatogramy (260 nm) na konci experimentů při různých teplotách). Negativní kontrola – **c)** a **d)**.

## 6.2 Tvorba J-dimerů

TPyzPzs měly tendenci tvořit v nekoordináčnících rozpouštědlech zajímavé supramolekulární útvary, proto jsme se rozhodli tuto problematiku důkladněji prozkoumat. Jako ideální rozpouštědlo byl vybrán toluen, protože se jedná o nekoordináční rozpouštědlo a TPyzPzs jsou v něm dobře rozpustné. Základním nástrojem této studie byly titrace toluenových roztoků TPyzPzs koordinačnícím rozpouštědlem.

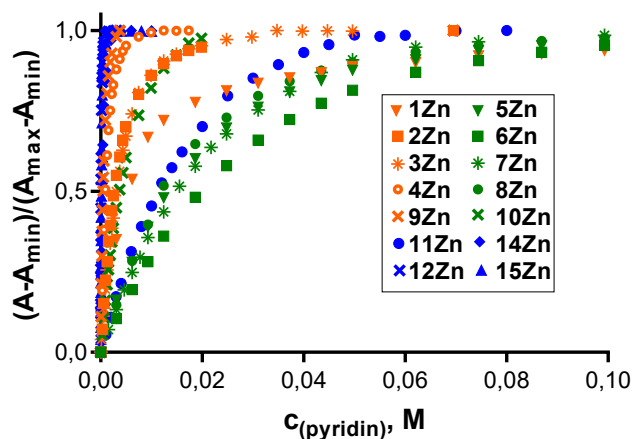
Při studiu agregačnícího chování sloučenin **3Zn**, **7Zn**, **9Zn** a **10Zn** v rámci práce **P2**, bylo prvním krokem stanovení rovnovážných konstant ( $K_D$ ,  $K_P$ ) dle postupů v kapitole 5.4. Přesné stanovení dimerizační konstanty  $K_D$  bylo možné pouze u sloučeniny **9Zn** ( $K_D = 1,1 \pm 0,14 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), neboť pouze u ní byla patrná monomerizace během ředění. U **3Zn**, **7Zn**, **10Zn** je díky méně objemné periferní substituci pevnost J-dimerů výrazně vyšší a je tedy možné pouze říct, že  $K_D$  je větší než  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  (Obr. 54a, b). Hodnotu  $K_P$  (Tabulka 3), což je rovnovážná konstanta zahrnující v sobě jak pevnost vazby molekul v J-dimeru tak ochotu koordinovat pyridin, bylo možné stanovit pro všechny studované TPyzPzs **3Zn**, **7Zn**, **9Zn** a **10Zn**, kdy síla koordinace mezi dvěma makrocycly klesala následovně **10Zn** > **7Zn** ~ **3Zn** > **9Zn** (Obr. 54c, d, e, f). Vyšší hodnota  $K_P$  značí menší stabilitu J-dimeru. Rovnovážnou konstantu  $K_P$  lze určit dvěma způsoby buď sledováním nárůstu absorbance Q-pásu monomeru (Obr. 54c, d) nebo poklesem emisního maxima dimeru (Obr. 54e, f). Obě metody poskytly srovnatelné výsledky, a potvrdily tak správnost získaných hodnot.



**Obr. 54** Určení rovnovážných konstant pro symetrické sloučeniny **10Zn** (a, c, e) a **9Zn** (b, d, f). Závislost absorpce na koncentraci TPyzPz (a, b); závislost absorpce TPyzPz na přidavku pyridinu (c, d), závislost fluorescence na přidavku pyridinu (e, f). Modře jsou vždy označena spektra monomerní a červeně spektra dimerů.

Jelikož pouze sloučenina **9Zn** poskytla jak hodnotu  $K_D$  ( $1.1 \pm 0.14 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), tak  $K_P$  ( $12,7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ ), mohla být následně použita na výpočet rovnovážné konstanty  $K_1$ , která poskytuje informaci o ochotě pyridinu koordinovat se na zinečnatý TPyzPz. Ze vztahu na Obr. 42b jsme tak získali hodnotu  $K_1$  rovnu  $4.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , kterou lze považovat za obecnou hodnotu pro sílu vazby dvojice pyridin-zinečnatý TPyzPz. Správnost stanovené konstanty potvrzuje fakt, že její hodnota koreluje s publikovanými daty podobných dvojic popsaných skupinou prof. Torrese.<sup>148</sup>

Podobně jako v práci **P2** zmíněné výše, umožnila série látek popisovaných v publikaci **P3** popis stability J-dimerů ve vztahu k objemnosti periferního substituentu. Nicméně díky větší škále nesympetrických sloučenin bylo možné porovnat detailněji i vliv funkčních skupiny na pevnost vazby molekul J-dimeru. V sérii látek s převažující bis(methoxyethyl)amino substitucí rostla hodnota  $K_P$  takto **1Zn**~**3Zn**~**2Zn**<**4Zn**<<**9Zn**, z čehož lze usuzovat, že funkční skupiny a zejména objemnost substituentu je nosoucího mají výrazně stabilizující efekt na pevnost J-dimeru. Stejný trend byl pozorován i u série TPyzPzs s převažující diethylamino substitucí, kde ale není tak výrazný vliv v závislosti na použité funkční skupině (stabilita dle  $K_P$  **5Zn**~**6Zn**~**7Zn**~**8Zn**>>**9Zn**) (Obr. 55).



Obr. 55 Graf závislosti absorbance  $Q$ -pásmu monomeru na koncentraci pyridinu.

Tabulka 3 shrnuje zjištěné hodnoty  $K_P$  téměř všech připravených TPyzPzs. Pokud se zaměříme na symetrické sloučeniny (**9Zn**, **10Zn**, **11Zn**, **12Zn**, **13Zn**), tak se nám potvrzuje teorie vlivu objemnosti substituentu na stabilitu J-dimeru. Tudiž TPyzPz **11Zn** s dimethylamino substitucí je nejvíce stabilní, kdežto u TPyzPz **9Zn** je pevnost J-dimerů výrazně nižší.

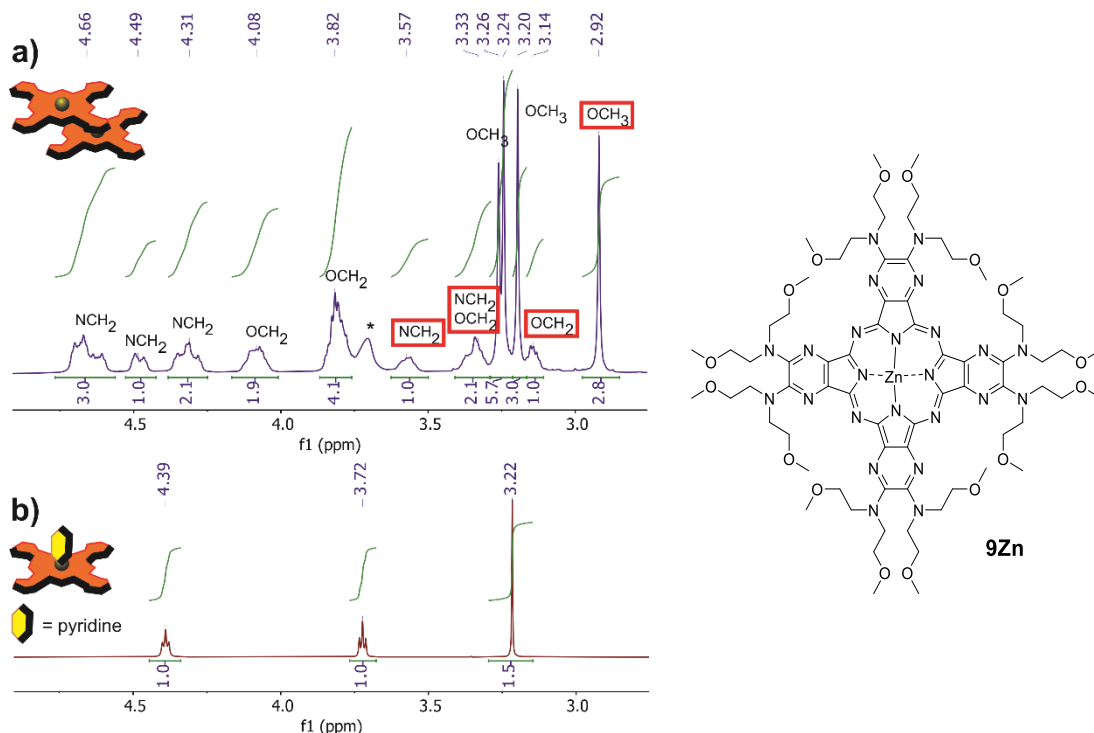
Tabulka 3 Porovnání rovnovážných konstant  $K_P$  připravených sloučenin. [a]  $K_D = 2,19 \pm 0,66 \times 10^{10} M^{-1}$  a  $K_I = 4,32 \times 10^4 M^{-1}$ , [b] špatná rozpustnost slpoučeniny v toluenu.

|            | $K_P (M^{-1})$     |             | $K_P (M^{-1})$        |
|------------|--------------------|-------------|-----------------------|
| <b>1Zn</b> | $2,1 \times 10^2$  | <b>9Zn</b>  | $12,7 \times 10^2$    |
| <b>2Zn</b> | $3,1 \times 10^2$  | <b>10Zn</b> | $1,9 \times 10^2$     |
| <b>3Zn</b> | $2,2 \times 10^2$  | <b>11Zn</b> | 2,84                  |
| <b>4Zn</b> | $7,9 \times 10^2$  | <b>12Zn</b> | $8,5 \times 10^2$ [a] |
| <b>5Zn</b> | $0,55 \times 10^2$ | <b>13Zn</b> | [b]                   |
| <b>6Zn</b> | $0,32 \times 10^2$ | <b>14Zn</b> | $4,02 \times 10^2$    |
| <b>7Zn</b> | $0,48 \times 10^2$ | <b>15Zn</b> | $1,86 \times 10^2$    |
| <b>8Zn</b> | $0,60 \times 10^2$ |             |                       |

Tvorba supramolekulárních útvarů látek použitých v práci **P2** byla detailně studována i pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) ve spolupráci s doc. PharmDr. Jiřím Kunešem, CSc. (Katedra organické a bioorganické chemie, FaF UK), kdy byl pozorován vliv makrocyclického jádra na stínění vodíků na periferních alkylamino substituentech.<sup>98</sup> U sloučenin **9Zn** a **10Zn** byly změřeny  $^1H$  a  $^{13}C$  spektra v toluenu (Obr. 56) a následně provedeny i pokročilé 2D experimenty, pomocí kterých bylo možno přiřadit signály vodíků v agregovaném vzorku. Přestože absorpční spektrum sloučeniny **9Zn** je monomerní při koncentraci 1  $\mu M$ , tak v koncentraci (10 mM) použité

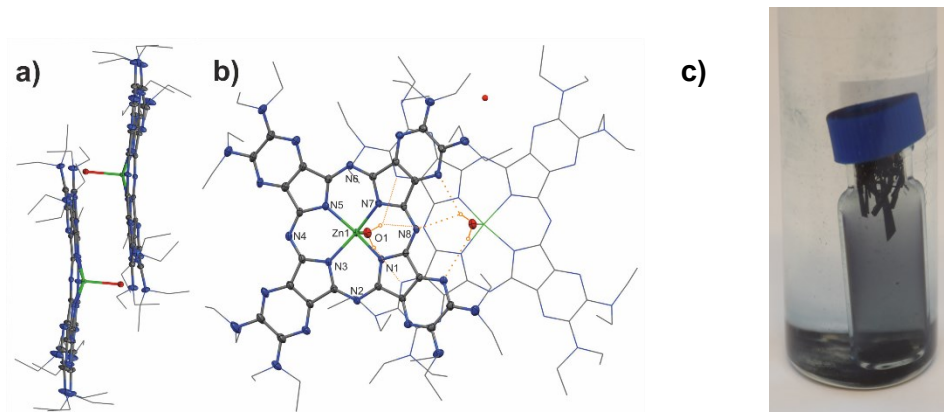


pro NMR měření je sloučenina agregovaná. Poměr štěpení signálů ukazuje, že nad makrocylem je vždy jedna čtvrtina druhého makrocylu.



**Obr. 56**  $^1\text{H}$  NMR spektra **9Zn** v  $\text{toluenu-}d_6$  (a) a v  $\text{pyridinu-}d_5$  (b). Hvězdička označuje zbytkovou vodu. Protony, které jsou ovlivněné stíněním protějšího makrocylu, jsou vyznačeny červenými čtverci.

U látek **9Zn** a **10Zn** se nám povedlo vypěstovat také krystaly, u kterých jsme poté chtěli zjistit, zda-li je supramolekulární chování těchto TPyzPzs stejné v roztoku i v pevné fázi. Krystaly TPyzPz **9Zn** a **10Zn** byly připravené volnou difuzí rozpouštědel (toluen – hexan) a zkoumány rentgenovou krystalografií ve spolupráci s prof. Ing. Alešem Růžičkou, Ph.D. (Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice). Z rentgenové krystalografie vyplynulo, že sloučeny jsou v dimerickém uspořádání, které je ale odlišné od uspořádání v roztoku potvrzeném NMR. Oproti uspořádání v roztoku je krystalický TPyzPz otočen o 45° okolo centrálního kationtu a je zde zcela jiný způsob koordinace. Do páté koordinační pozice zinečnatého kationtu je koordinován atom kyslíku pocházejícího z vody, jejíž vodíky vytvářejí vodíkové můstky k pyrazinovým a azamethinovým dusíkům protější molekuly (Obr. 57).



**Obr. 57** Krystalografická struktura sloučeniny **10Zn**. Pohled z boku (a) a ze shora (b). Barevné označení atomů: dusík – modrá, zinek – zelená, kyslík – červená, uhlík – šedá, vodíky obsažené ve vodě – oranžová. Pro přehlednost ostatní vodíky nejsou zobrazeny, vodíkové můstky v dimerickém uspořádání jsou zvýrazněny oranžově. c) krystaly **9Zn**.

### 6.3 Fotofyzikální vlastnosti

Fotofyzikální parametry nasynetizovaných TPyzPzs byly určeny pomocí standardních postupů uvedených v kapitole 5.3. Zkoumané TPyzPzs v monomerní formě (tj. v DMF) vykázaly předpokládané fotofyzikální vlastnosti, kdy jejich kvantové výtěžky  $^1\text{O}_2$  a fluorescence byly téměř nulové ( $\Phi_{\Delta} < 0,0234$  a  $\Phi_F < 0,0042$ ) díky účinnému ICT (Tabulka 4). Běžně se hodnoty  $\Phi_{\Delta}$  u dobrých PS pohybují nad 0,50, hodnoty  $\Phi_F$  pro kvalitní fluorofory nad 0,20. Téměř nulová produkce fluorescence předurčuje mnou připravené alkyalaminové TPyzPzs k použití jako tzv. „dark quenchers“ – tedy zhášeců bez své vlastní fluorescence.

K zajímavým závěrům jsme došli při porovnání fotofyzikálních dat u alkyalaminových TPyzPzs ve formě monomeru vs. J-dimeru. Účinnost ICT je obecně silně závislá na polaritě prostředí, proto bylo potřeba zajistit srovnatelnou polaritu prostředí,<sup>84, 149</sup> ve kterém bude sledování vlastností monomeru vs. J-dimeru probíhat. Jednotlivé experimenty proto probíhaly v prostředí toluenu (J-dimery) nebo v toluenu s 0,1 M pyridinem (monomery). Tento malý podíl pyridinu neovlivní signifikantně polaritu prostředí, a přitom zajistí plnou monomerizaci TPyzPz.

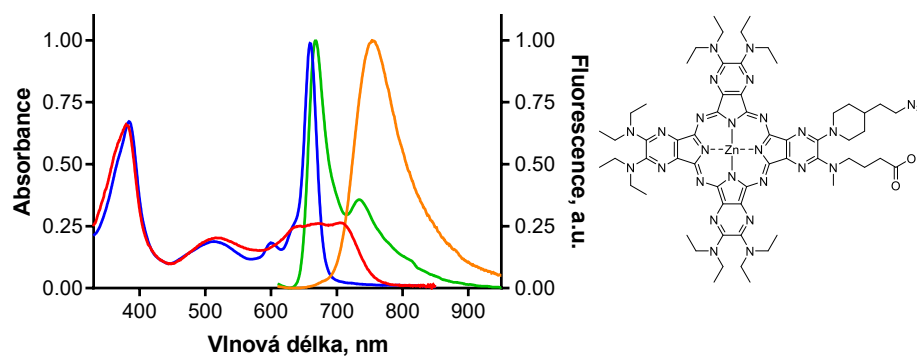
**Tabulka 4** Porovnání fotofyzikálních parametrů zinečnatých TPyzPzs v monomerním a dimerizovaném stavu. [a] nelze stanovit všechny parametry vlivem špatné rozpustnosti v toluenu.

|            | Toluen (J-dimery) |                |                 |          | Toluen + 0.1 M pyridin (monomery) |                  |                 |          |
|------------|-------------------|----------------|-----------------|----------|-----------------------------------|------------------|-----------------|----------|
|            | $\lambda$ , nm    | $\lambda$ , nm | $\Phi_{\Delta}$ | $\Phi_F$ | $\lambda$ , nm                    | $\lambda_F$ , nm | $\Phi_{\Delta}$ | $\Phi_F$ |
| <b>1Zn</b> | 709               | 766            | 0,029           | 0,0012   | 662                               | 671              | 0,023           | 0,00031  |
| <b>2Zn</b> | 708               | 765            | 0,063           | 0,0027   | 662                               | 670              | 0,026           | 0,00040  |
| <b>3Zn</b> | 711               | 763            | 0,12            | 0,0075   | 660                               | 669              | 0,028           | 0,0011   |

|             | Toluen (J-dimery) |                |                 |          | Toluen + 0.1 M pyridin (monomery) |                  |                 |          |
|-------------|-------------------|----------------|-----------------|----------|-----------------------------------|------------------|-----------------|----------|
|             | $\lambda$ , nm    | $\lambda$ , nm | $\Phi_{\Delta}$ | $\Phi_F$ | $\lambda$ , nm                    | $\lambda_F$ , nm | $\Phi_{\Delta}$ | $\Phi_F$ |
| <b>4Zn</b>  | 708               | 762            | 0,13            | 0,0071   | 661                               | 669              | 0,030           | 0,0011   |
| <b>5Zn</b>  | 700               | 758            | 0,055           | 0,0015   | 660                               | 669              | 0,025           | 0,0010   |
| <b>6Zn</b>  | 704               | 755            | 0,12            | 0,0086   | 660                               | 668              | 0,047           | 0,0014   |
| <b>7Zn</b>  | 705               | 752            | 0,24            | 0,022    | 659                               | 667              | 0,056           | 0,0032   |
| <b>8Zn</b>  | 701               | 752            | 0,22            | 0,020    | 660                               | 668              | 0,049           | 0,0033   |
| <b>9Zn</b>  | 706               | 768            | 0,090           | 0,0004   | 661                               | 665              | 0,029           | 0,0009   |
| <b>10Zn</b> | 699               | 750            | 0,28            | 0,027    | 659                               | 665              | 0,056           | 0,00043  |
| <b>11Zn</b> | 703               | 752            | 0,063           | 0,0089   | 655                               | 662              | 0,034           | 0,0002   |
| <b>12Zn</b> | 708               | 751            | 0,26            | 0,029    | 659                               | 667              | 0,081           | 0,0086   |
| <b>13Zn</b> | 732               | [a]            | 0,26            | 0,023    | [a]                               | 656              | 0,33            | 0,028    |
| <b>14Zn</b> | 708               | 755            | 0,28            | 0,019    | 659                               | 666              | 0,037           | 0,0029   |
| <b>15Zn</b> | 705               | 761            | 0,22            | 0,010    | 659                               | 666              | 0,032           | 0,0017   |

Z výsledků v Tabulce 4 je patrné, že molekuly ve formě J-dimerů mají několikanásobně vyšší (až 7krát) kvantové výtěžky než sloučeniny monomerní, což je způsobeno zřejmě blokací ICT v dimerizovaném stavu. Za zmínku stojí fakt, že se jedná o naprosto unikátní jev, neboť agregace obecně vede u Pc a AzaPc k výraznému poklesu kvantových výtěžků.

Dalším důsledkem tvorby J-dimerů u TPyzPzs byl Stokesův posun 50 nm, což je velice ojedinělé u tohoto typu sloučenin, neboť samotné monomerní TPyzPzs mají Stokesův posun obvykle pouze 5–10 nm (Obr. 58).<sup>99</sup>



Obr. 58 Rozdíl v absorpčním a emisním spektru vyobrazeného TPyzPz – **absorpční** a **emisní** spektrum monomeru, **absorpční** a **emisní** spektrum dimeru.

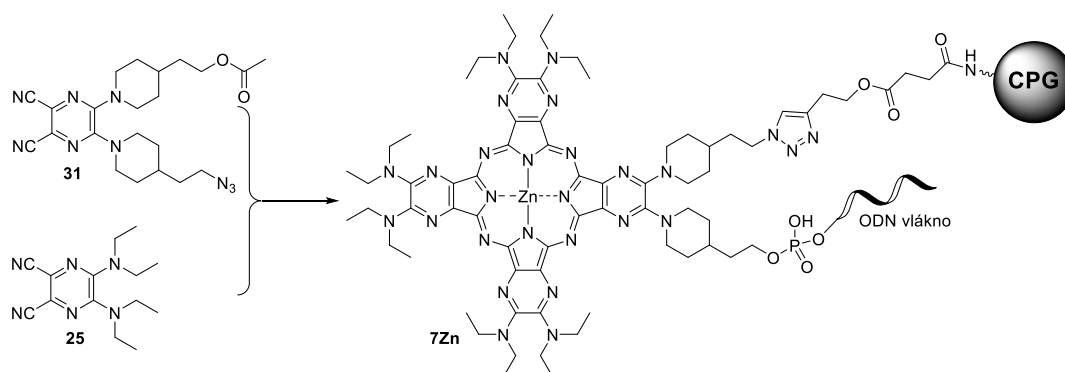
## 6.4 Studium TPyzPzs po navázání na ODN řetězec

V této části disertační práce jsem se zaměřil na detailnější popis stěžejních výsledků, které se zabývají chováním ODN sond značených TPyzPz během hybridizačních testů.

### 6.4.1 Porovnání efektivity zhášení TaqMan<sup>®</sup> sond s TPyzPz proti sondám s komerčními zhášeči (P1)

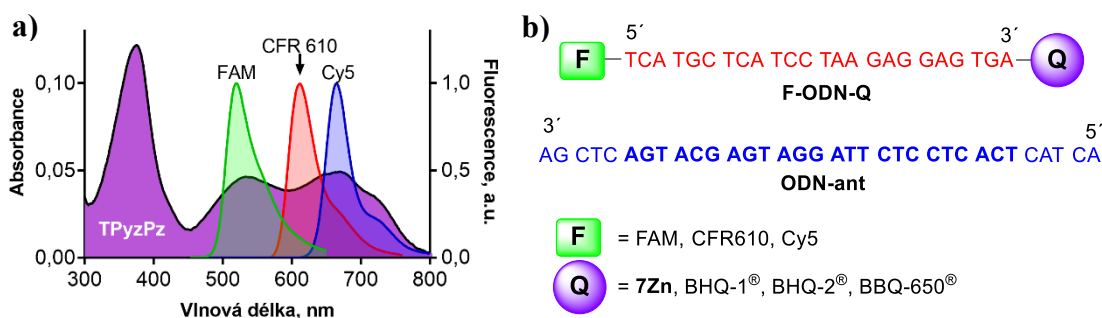
Tento projekt navazoval na naši publikaci,<sup>130</sup> kde bylo poprvé popsáno možné použití TPyzPzs u jednoduše značených sond. Cílem mého navazujícího projektu bylo srovnat použitelnost TPyzPzs jako zhášečů fluorescence v hydrolyzačních sondách a srovnat efektivitu zhášení s komerčními zhášeči (BHQ-1<sup>®</sup> a BBQ-650<sup>®</sup>) v návaznosti na použitý fluorofor (FAM, CFR610 a Cy5).

Nejprve bylo nutné navrhnout cílovou strukturu molekuly, která by umožnila vazbu TPyzPz na 3'-konec řetězce (Obr. 59). Zvolili jsme TPyzPz nesoucí azidovou skupinu a hydroxylovou skupinu. Azidová skupina umožnila připojení TPyzPz k pevné fázi pomocí azido-alkynové Huisgen cykloadice, na hydroxylové skupině následně začala syntéza ODN vlákna.



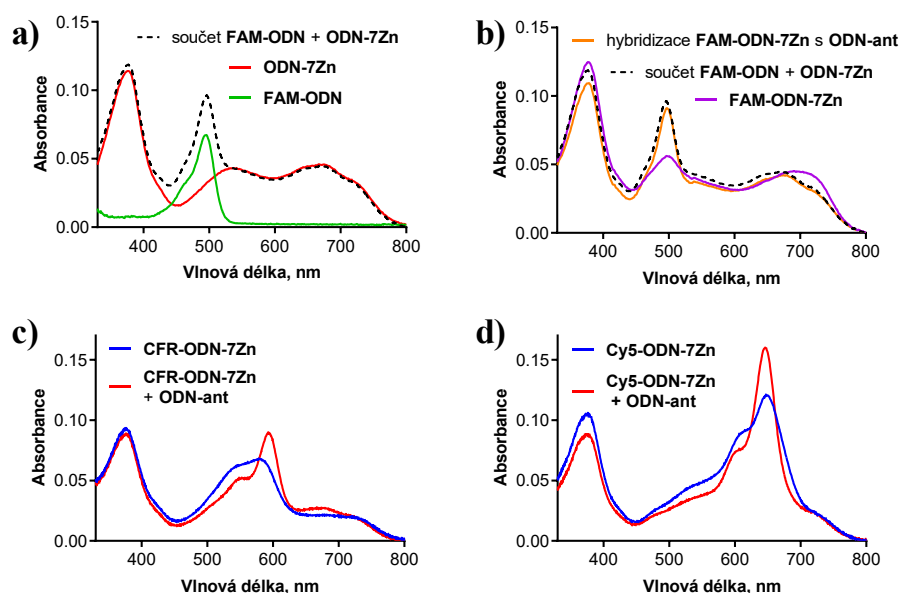
Obr. 59 Zjednodušené schéma syntézy TPyzPz 7Zn.

Při návrhu značení sondy, na které mělo být provedeno zkoumání účinnosti zhášení, byl kladen důraz na výběr vhodných fluoroforů. Důraz byl kladen především na to, aby jejich emisní spektrum pokrylo co největší rozsah vlnových délek, čímž lze posléze posoudit univerzálnost daného zhášeče (Obr. 60a). Samotná sekvence nukleotidů v ODN řetězci ODN byla zvolena tak, aby bylo možné sondu následně použít k určení reálného vzorku (Obr. 60b),<sup>132</sup> konkrétně pro kvantifikaci transportního genu SLCO2B1, který kóduje transportní protein pro organické anionty v jaterních buňkách.



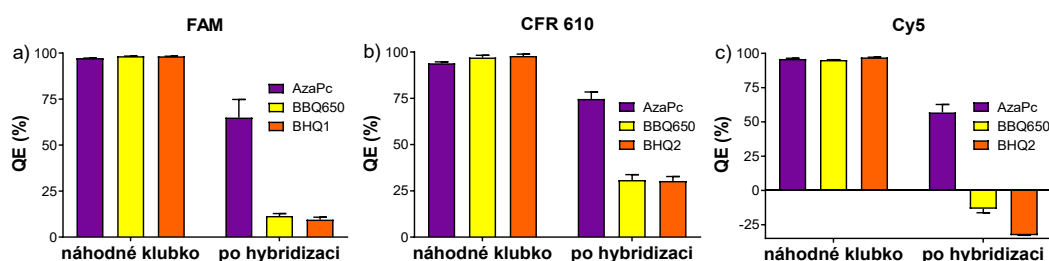
**Obr. 60** a) Překryv emisních spekter použitých fluoroforů s absorpčním spektrem TPyzPz 7Zn; b) sekvence nukleotidů, které tvořily jednotlivé ODN sondy.

Při zkoumání absorpčních spekter všech připravených sond typu **F-ODN-Q** jsme potvrdili, že pokud jsou sondy volně v roztoku, vytváří fluorofor se zhášecem heterodimer. Tato tvorba heterodimeru byla potvrzena na základě porovnání absorpčních spekter před a po hybridizaci s antisense vláknem (**ODN-ant**). Před hybridizací neodpovídaly absorpční spektra dvojitě značených sond součtu absorpčních spekter příslušných jednoduše značených sond (Obr. 61). Tato změna tvaru absorpčního spektra je jasným důkazem kontaktní interakce dvou molekul a tvorby heteromeru. Naopak po hybridizaci výsledné absorpční spektrum již plně odpovídalo součtu příslušných absorpčních spekter jednoduše značených sond, což potvrdilo rozvolnění heteromeru a zánik mezimolekulárních interakcí.



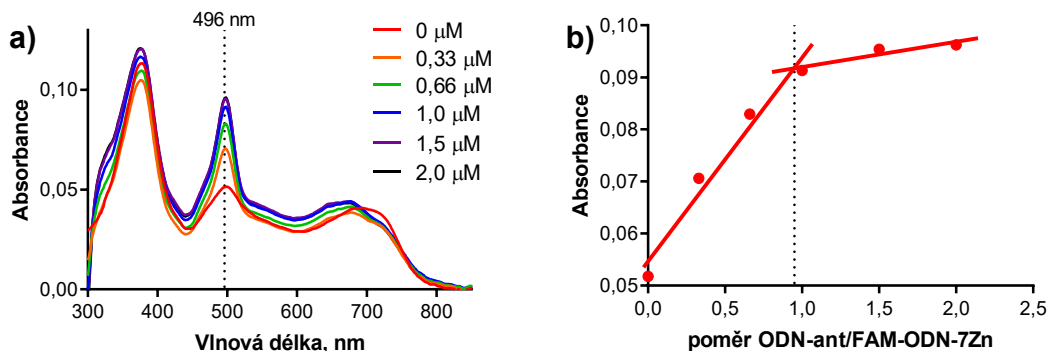
**Obr. 61** Porovnání absorpčních spekter sond **F-ODN-7Zn**. a) a b) ukazují teoretický součet absorpčních spekter sonda značených pouze pomocí FAM, nebo 7Zn a následně porovnání s hybridizovanou sondou **FAM-ODN-3Zn**; c) a d) znázorňují změnu absorpčních spekter před (modré) a po hybridizaci (červené) pro zbylé dva fluorofory.

Stanovení účinnosti zhášení bylo prováděno podle postupu uvedeného v kapitole 5.2. Z výsledků vyplývá, že účinnost zhášení v náhodném klubku byla pro všechny zhášeče u různých fluoroforů téměř stejná a přesahující 95 % (Obr. 62). Z hlediska statického zhášení vykazují tedy TPyzPz srovnatelnou účinnost zhášení s komerčně dostupnými zhášeči. Mnohem větší diverzita výsledků byla následně patrná při zkoumání účinnosti zhášení po hybridizaci, kdy se uplatňuje především zhášení pomocí FRET. V účinnosti zhášení po hybridizaci TPyzPz **7Zn** signifikantně převyšoval účinnost zhášení komerčních zhášečů. Záporné hodnoty účinnosti zhášení po hybridizaci u Cy5 jsou způsobeny nižší fluorescencí po fragmentaci DNázou než během hybridizace, což je způsobeno pravděpodobně interakcí cyaninového barviva s nukleosidovými bázemi antisense vlákna. Tento jev není ještě plně objasněn, ale byl pozorován i v naší předchozí práci<sup>150</sup> a v publikaci jiné výzkumné skupiny.<sup>12</sup>



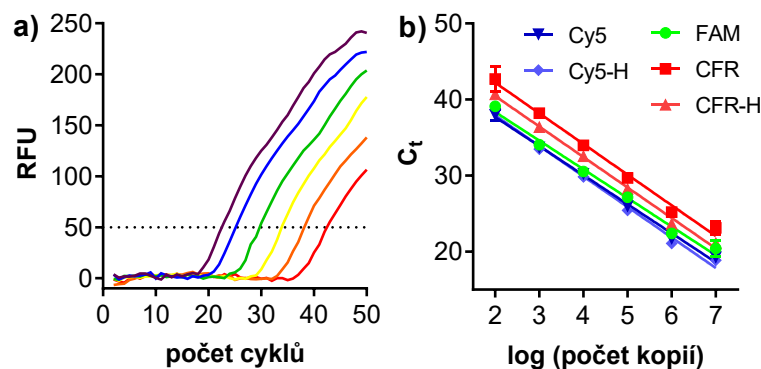
**Obr. 62** Porovnání účinnosti zhášení jednotlivých zhášečů v závislosti na použitém fluoroforu a) fluorescein, b) CAL Fluor Red 610, c) Cyanine 5.

Chtěli jsme se také ujistit, že TPyzPzs neovlivňují schopnost ODN řetězce sondy nasedat na komplementární vlákno, proto jsme provedli hybridizační titraci **FAM-ODN-7Zn** založené na sledování změn v absorpčních spektrech. Experiment spočíval v postupném přidávání antisense vlákna **ODN-ant** k roztoku sondy, kdy se vždy musel opakovat krok zahřátí roztoku a následné pozvolné chladnutí z důvodu opakované denaturace a následné hybridizace sondy na antisense vlákno (Obr. 63a). Na výsledném grafu závislosti absorbance FAM při 496 nm na přidaném ekvivalentu antisense je patrný výrazný zlom, jehož poloha ukazuje, že sonda se váže k antisense vláknu v poměru 1:1 (Obr. 63b). Z těchto výsledků je patrné, že TPyzPzs nijak hybridizaci vláken negativně neovlivňují, protože z logiky věci by se komplementární vlákna měla k sobě vázat v poměru 1:1 pokud je to možné.



**Obr. 63** Titrace **FAM-ODN-7Zn** pomocí antisense. **a)** absorpční spektrum; **b)** závislost absorbance **FAM** na poměru sonda/antisense.

Po výborných výsledcích sondy značené **TPyzPz 7Zn** v zjednodušeném TaqMan<sup>®</sup> modelu jsme chtěli vyzkoušet použitelnost našich sond v reálném prostředí při kvantifikaci transportního genu **SLCO2B1**, který obsahuje komplementární sekvenci k **ODN**. Byla provedena řada qPCR stanovení cílového genu **SLCO2B1** s decimálním ředěním cílové sekvence (Obr. 64a). Následně byly vytvořeny kalibrační křivky pro jednotlivé sondy (Obr. 64b). Experiment prokázal, že **TPyzPz 7Zn** lze využít i v reálných aplikacích a že jeho účinnost je minimálně srovnatelná s komerčně dostupnými zhášeci používanými běžně v praxi. Veškeré qPCR experimenty byly prováděny v triplicátu.



**Obr. 64** Výsledky qPCR. **a)** příklad multiplikace cílového genu v decimálním ředění za využití **CFR-ODN-7Zn** (150 nM); **b)** kalibrační křivka pro **TPyzPz** sondy (150 nM), kde sondy s **CFR610** a **Cy5** byly testovány ve dvou rozdílných koncentracích (označeno písmenem „H“, 250 nM).

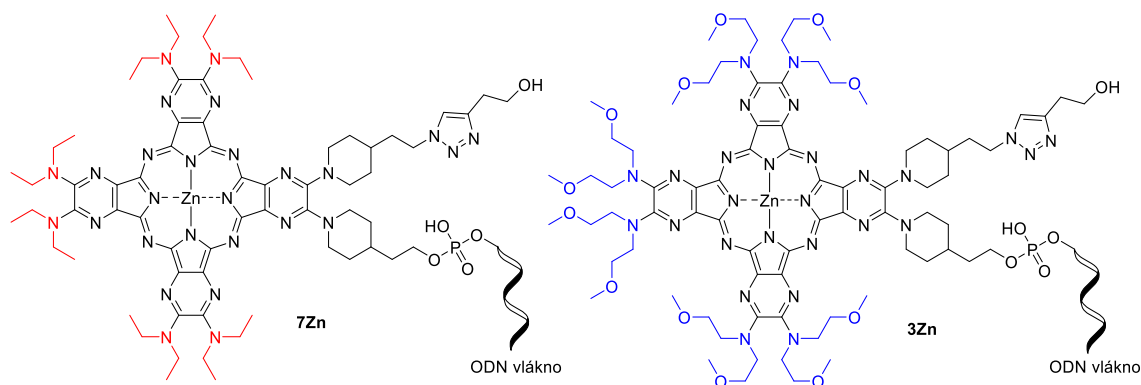
Z tohoto projektu vyplynulo, že **TPyzPz**s zhášeci mají výrazně lepší chování ve zjednodušeném modelu PCR než komerčně dostupné zhášeci, a to především díky účinnějšímu zhášení po hybridizaci sondy. V reálných testech kvantifikace transportního genu **SLCO2B1** měly sondy nesoucí **TPyzPz** zhášec srovnatelné výsledky jako sondy s komerčními zhášeci, ale je nutno přihlídnout k tomu, že na rozdíl od komerčních zhášeců byl třeba pouze jeden **TPyzPz** zhášec pro všechny tři fluorofory. Tato

univerzálnost TPyzPzs je dána širokým absorpčním spektrem TPyzPzs pokrývající vlnové délky 300-800 nm.

#### 6.4.2 Studium tvorby J-dimerů u ODN řetězců (**P2**)

Obsah této studie plynule navazuje na moji práci **P1** a rozšiřuje poznatky předchozího projektu ve směru tvorby J-dimerů TPyzPzs po jejich vazbě na ODN. Touto problematikou jsme se začali zabývat, protože jsme pozorovali podobnost v oblasti Q-pásu mezi absorpčními spektry sond značených pomocí TPyzPz a J-dimery samotných TPyzPzs v toluenu. Při experimentech jsme pozorovali vznik zajímavého útvaru – heterotetrameru, který bude popsán níže.

Pro porovnání rozdílu mezi monomerním a dimerním TPyzPz vázaným na ODN vláknu bylo nutné připravit sloučeninu, která bude buď hydrofilnější, tudíž se zmenší vliv agregace pomocí potlačení hydrofobních interakcí, nebo bude mít objemnější periferní substituci, která stericky zabrání agregaci. Nakonec byl zvolen derivát TPyzPz, který kombinoval oba přístupy. Docíleno toho bylo náhradou periferních diethylaminových skupin molekuly **7Zn** objemnějšími a zároveň hydrofilnějšími bis(methoxyethyl)aminovými skupinami (Obr. 65). Pro zjednodušení interpretace výsledků některých experimentů v organických rozpouštědlech byly připraveny i odpovídající symetrické TPyzPzs **9Zn** a **10Zn**.



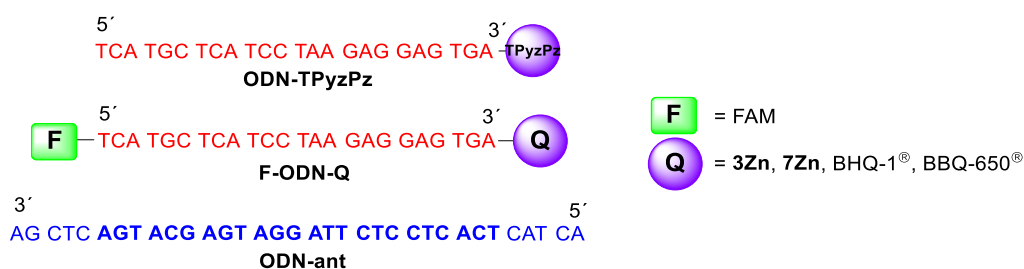
Obr. 65 Změna převažující periferní substituce.

Jak je již zvykem, začali jsme od pozorování jednoduchých systémů a postupně se propracovávali ke složitějším. Prvním krokem byl popis agregací chování roztoku TPyzPzs v toluenu, kde bylo na základě zjištěných údajů (**K<sub>P</sub>**) možné porovnat stabilitu J-dimerů. Síla koordinace mezi dvěma makrocycly klesá následovně **10Zn** > **7Zn** ~ **3Zn** > **9Zn**. Tudíž nejpevněji drží J-dimery tvořené symetrickým TPyzPz s diethylamino substitucí. Podle NMR studie jsme zjistili, že v J-dimeru je nad makrocyclem vždy jedna čtvrtina druhého makrocycly. Krystalografická studie pak odhalila, že struktura dimerů



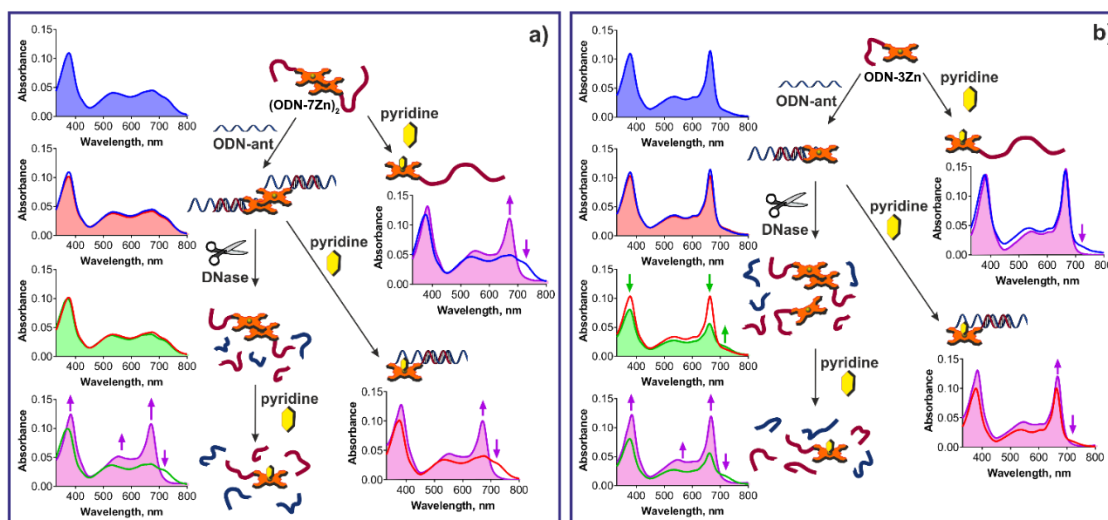
v pevném stavu je odlišná od J-dimeru v roztoku. Detailněji je tato problematika popsána v kapitole 6.2.

V této části disertační práce bych se chtěl zaměřit na specifické aspekty dimerizace TPyzPzs po jejich navázání na ODN. Pro tento projekt byly připraveny 3 nové ODN sondy (**FAM-ODN-3Zn**, **ODN-3Zn**, **ODN-7Zn**), zbylé 3 sondy byly již připraveny pro předchozí projekt **P1** (Obr. 66).



Obr. 66 Sekvence ODN sond v P2.

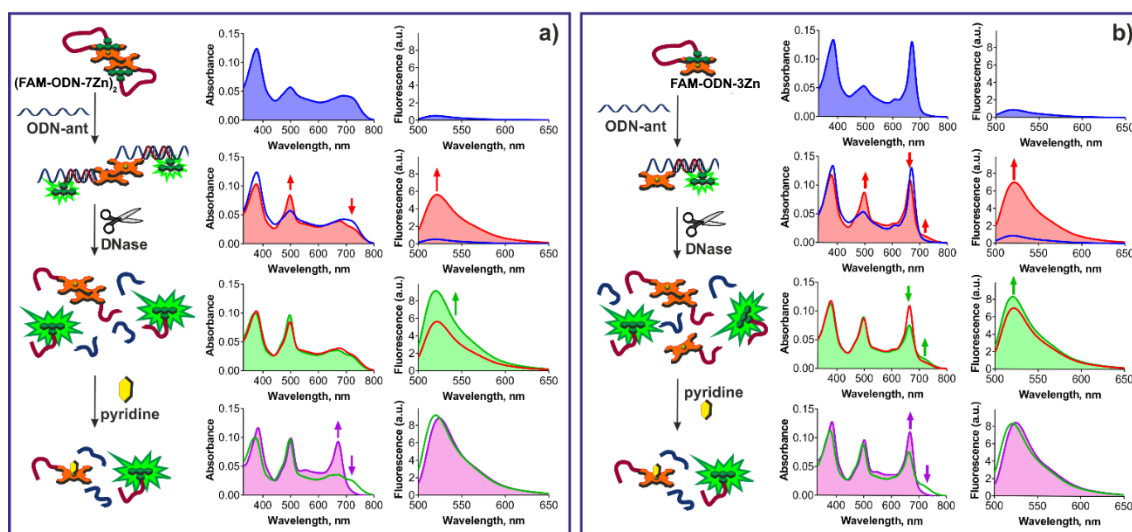
Sledováním změn absorpčních spekter různě modifikovaných ODN sond jsme studovali tvorbu a vlastnosti J-dimerů u připravených sond. V prvním experimentu jsme připravili 1  $\mu$ M roztok sondy v pufru, provedli hybridizaci, fragmentaci ODN pomocí DNázy a nakonec titrovali pyridinem. V druhém typu experimentu už neprobíhala fragmentace DNázou, ale pyridin byl přidáván okamžitě po hybridizaci s antisense. V posledním schématu experimentu byla pyridinem titrována rovnou samotná ODN sonda (viz schématická část Obr. 67). U jednoduše značených ODN sond **ODN-3Zn** a **ODN-7Zn** jsme zjistili, že absorpční spektrum zůstává během hybridizačního testu neustále stejné (v náhodném klubku, po hybridizaci i po fragmentaci), dle tvaru spektra se jedná v případě **ODN-7Zn** jednoznačně o J-dimer, zatímco **ODN-3Zn** vykazuje převážně charakter monomerního spektra. Po fragmentaci **ODN-3Zn** došlo k prohloubení agregovaného charakteru spektra, pravděpodobně vlivem nižšího solubilizačního efektu ODN vlákna, čímž převládly hydrofobní interakce makrocyclického jádra **3Zn**. K monomerizaci **ODN-7Zn** došlo vždy až po přidání pyridinu (Obr. 67). Tyto experimenty dokázaly, že tvorbu J-dimerů téměř neovlivní navázání na ODN řetězec, neboť srovnatelné chování bylo pozorováno i při studiu TPyzPzs v toluenu.



**Obr. 67** Změny v absorpčním spektru **ODN-7Zn** (a, tvoří J-dimer (**ODN-7Zn**)<sub>2</sub>) a **ODN-3Zn** (b) v hybridizačním pufru během hybridizačních/hydrolyzačních experimentů a po přidavku pyridinu; modrá – samotná sonda v pufru, červená – po hybridizaci s antisense **ODN-ant**, zelená – po hydrolyze DNázou, fialová – po přidavku pyridinu.

Stejně experimenty jako u jednoduše značených sond byly provedeny i u dvojité značených sond **FAM-ODN-3Zn** a **FAM-ODN-7Zn**, kde byly kromě absorpčních spekter sledovány v každém kroku i spektra emisní, což může naznačit tvorbu supramolekulárních útvarů mezi FAM a TPyzPz (heteromerů). Absorpční spektra **FAM-ODN-7Zn** (Obr. 68a) ukázala, že pokud je sonda v pufru, je možné pozorovat Q-pás charakteru agregované sloučeniny **7Zn** (tedy jako J-dimer) a náznak absorpčního pásu FAM (modré spektrum). Fluorescence je účinně zhasena především díky statickému zhasení, což ukazuje na přítomnost heterodimeru mezi FAM a TPyzPz. Po následné hybridizaci dochází k nárůstu absorpčního pásu FAM, protože dojde k rozvolnění heterodimeru **FAM-7Zn**, ale Q-pás TPyzPz i nadále vykazuje charakter J-dimeru (červené spektrum). Nárůst fluorescence po hybridizaci též potvrzuje rozvolnění heterodimeru **FAM-7Zn**, jelikož FAM není v tuto chvíli zhasen statickým zhasením (červené spektrum) a FRET není tak účinný jako statické zhasení. Po fragmentaci sondy **FAM-ODN-7Zn** nedochází téměř k žádným změnám v absorpčním spektru (TPyzPz je tedy v roztoku stále v agregované formě), ale narůstá fluorescence, protože se ještě více oddálí FAM od zhasěče **7Zn** a ten je v této chvíli v roztoku zcela mimo dosah FRET (zelená spektra). K monomerizaci **7Zn** dojde až po přidání pyridinu, což je patrné z nárůstu v oblasti Q-pásu absorpčního spektra (fialové spektrum). Z výše uvedených poznatků usuzujeme, že sonda **FAM-ODN-7Zn** tvoří v pufru unikátní prostorový útvar – heterotetramer, který je tvořen dvěma heterodimery **FAM-7Zn**, které jsou spojeny J-dimerem molekuly **7Zn**. ODN vlákna poté tvoří pomyslné číslo osm, kde v jeho středu je právě zmiňovaný heterotetramer. Odlišné chování bylo pozorováno u sondy

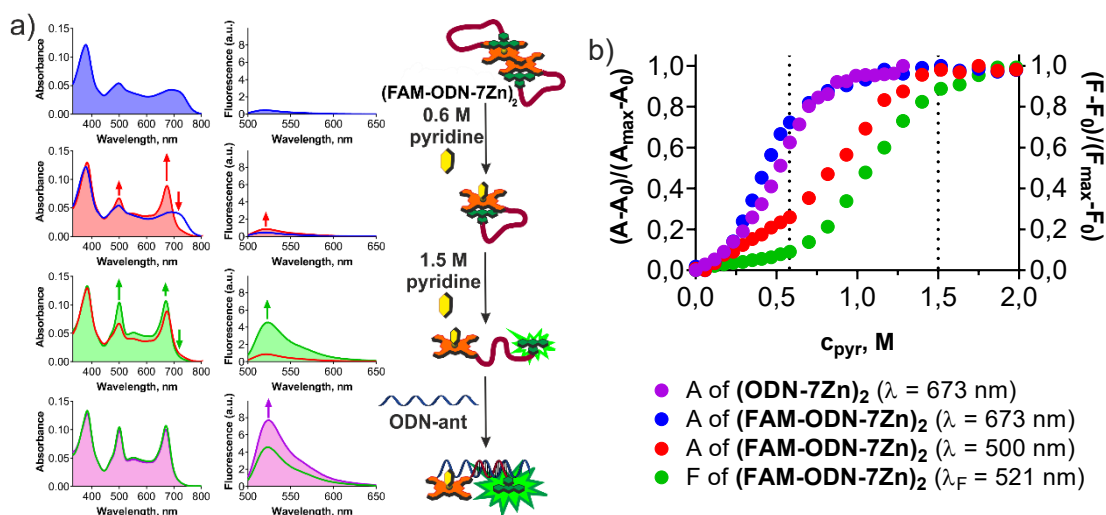
**FAM-ODN-3Zn**, která se na počátku experimentu uskupila pouze do heterodimeru tvořeného FAM a monomerním TPyzPz (Obr. 68b). To bylo jednoznačně patrné z přítomnosti ostrého Q-pásu sloučeniny **3Zn** a nulové fluorescence dané statickým zhášením po tvorbě dimeru FAM s TPyzPz (modré spektrum). Jediná výraznější změna v absorpčních spektrech nastala po hybridizaci, kdy došlo k nárůstu absorpčního pásu FAM (červené spektrum). Emisní spektra se měnila podobně jako u předchozí sondy, tedy k nejvýraznějšímu nárůstu intenzity fluorescence došlo po hybridizaci díky potlačení statického zhášení a následně ještě lehce po fragmentaci sondy.



*Obr. 68* Změny v absorpčních a emisních spektrech **FAM-ODN-7Zn** (a, tvoří heterotetramer (**FAM-ODN-7Zn**)<sub>2</sub>) a **FAM-ODN-3Zn** (b) v hybridizačním pufru během hybridizačních/hydrolyzačních experimentů a po přidavku pyridinu; modrá – samotná sonda v pufru, červená – po hybridizaci s antisense **ODN-ant**, zelená – po hydrolyze DNázou, fialová – po přidavku pyridinu.

V dalších experimentech jsme se rozhodli zjistit stabilitu heterotetrameru a zdali je stabilnější v tomto uspořádání J-dimer TPyzPzs nebo heterodimer TPyzPz-FAM. Toto bylo studováno na základě přidavků pyridinu k **FAM-ODN-7Zn**. Po analýze absorpčních a emisních spekter vyplynulo, že přidavkem pyridinu až do koncentrace 0,6 M se nejprve rozvolní J-dimer (**7Zn**)<sub>2</sub> (mění se absorpční spektra v oblasti Q-pásu, minimálně v oblasti FAM a nedochází k nárůstu fluorescence FAM). Dalšími přidavky pyridinu mezi 0,6-1,5 M dojde k rozvolnění heterodimeru TPyzPz-FAM (Obr. 69a), což naznačuje nárůst absorpčního pásu v oblasti FAM a zároveň dochází k nárůstu fluorescence FAM – Obr. 69a, zelená spektra. Po přidání **ODN-ant** dochází pouze k nárůstu fluorescence FAM, protože dojde k většímu oddálení FAM a TPyzPz, takže dojde k oslabení zhášení pomocí FRET. Absorpční spektra v tomto případě zůstávají shodná, protože heterodimer zůstává rozvolněn. Obr. 69b ukazuje průběh titrace během experimentů studujících stabilitu heterotetrameru. Modrá (dvojitě značená sonda) a fialová (jednoduše značená

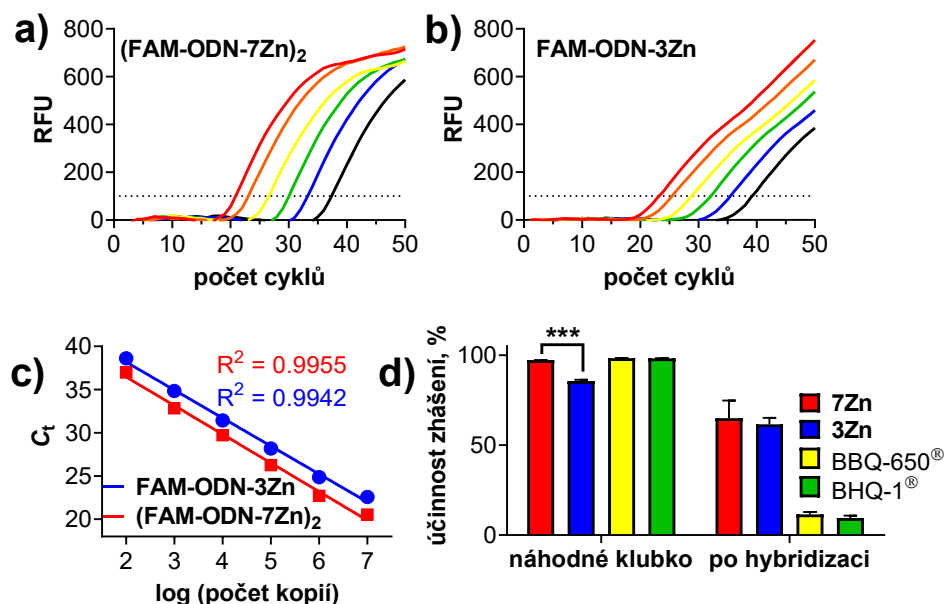
sonda) křivka popisují nárůst absorpce monomerní formy TPyzPz **7Zn** v závislosti na koncentraci pyridinu. Tím, že modrá křivka kopíruje fialovou křivku, u které je možné pouze rozvolnění J-dimeru, byl potvrzen fakt, že J-dimer je téměř rozvolněn do 0,6 M koncentrace pyridinu v obou případech. Červená křivka dokumentuje nárůst absorpce FAM, kdy strmější nárůst je patrný mezi 0,6–1,5 M koncentrací pyridinu, což ukazuje na rozvolnění FAM-**7Zn**. Poslední křivka (zelená) ukazuje nárůst fluorescence, ke kterému dochází nejvíce během rozvolňování heterodimeru FAM-**7Zn** při koncentraci pyridinu nad 0,6 M. Výsledky zobrazené v grafu (Obr. 69b) prokázaly, že heterodimer FAM-**7Zn** vykazuje pevnější vazbu než J-dimer (**7Zn**)<sub>2</sub>.



**Obr. 69** Titrace FAM-ODN-7Zn pyridinem. **a)** absorpční a emisní spektra, modrá – samotná sonda v pufru, červená – konc. pyridinu 0,6 M, zelená – konc. pyridinu 1,5 M, růžová – po hybridizaci s antisense ODN-ant; **b)** porovnání normalizované absorpce TPyzPz a fluorescence FAM v závislosti na koncentraci pyridinu.

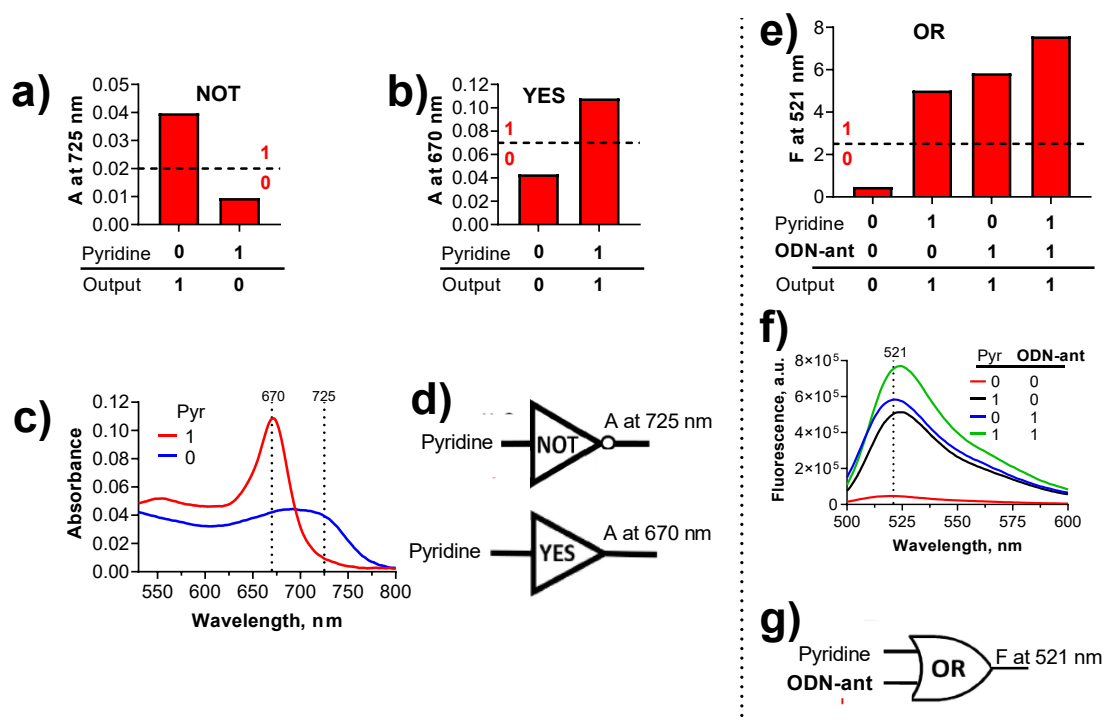
V neposlední řadě jsme se zaměřili na porovnání vlivu přítomnosti J-dimeru na účinnost zhášení a použitelnost ODN sond během qPCR experimentů. Větší objemnost periferních substituentů u sloučeniny **3Zn** měla za následek snížení stability heterodimeru TPyzPz-FAM, a tudíž částečné snížení účinnosti zhášení v náhodném klubku. Pokud vyjádříme snížení stability heterodimeru poklesem účinnosti zhášení, tak sonda FAM-ODN-**3Zn** je o 10 procentních bodů méně účinná než FAM-ODN-**7Zn** (Obr. 70d). Na účinnost zhášení po hybridizaci nemá objemnější substituce **3Zn** již téměř žádný vliv, protože ke zhášení dochází FRET mechanismem. Při samotných qPCR experimentech na reálném vzorku bylo zjištěno, že sonda FAM-ODN-**7Zn** má lepší nárůst fluorescence během opakování cyklů qPCR (Obr. 70a, b). Během qPCR bylo dále zjištěno, že FAM-ODN-**7Zn** má přibližně o 10 % lepší poměr mezi ON a OFF stavem než FAM-ODN-**3Zn** (příslušná data nejsou v Obr. 70 zobrazena), což je způsobeno vyšší stabilitou heterodimeru a vyšší účinností zhášení v náhodném klubku u sondy

**FAM-ODN-7Zn**. Nižší účinnost zhášení v náhodném klubku **FAM-ODN-3Zn** má za následek zvýšení fluorescence pozadí během qPCR, což je nežádoucí jev. Kalibrační křivky získané během qPCR byly lineární s hodnotou koeficientu determinace vyšší než 0,99 (Obr. 70c).



*Obr. 70 Vyhodnocení qPCR a hybridizačních experimentů. Kvantitativní vyhodnocení multiplikace transportního genu *SLCO2B1* (RFU – relativní jednotka fluorescence) (a + b). c) Kalibrační křivky na základě dat z a a b. d) porovnání účinnosti zhášení během hybridizačních experimentů \*\*\* $P < 0,05$  (Welchův test).*

Selektivní změny v intenzitě fluorescence nebo absorpčních spektrech sondy **FAM-ODN-7Zn** otevírají také možnost využití v oblasti biomolekulárních logických bran.<sup>150, 151</sup> Fluorescence systému heterotetrameru  $(\text{FAM-ODN-7Zn})_2$  může být spuštěna dvěma různými vstupními informacemi – přítomností antisense **ODN-ant** nebo přítomností koordinačního rozpouštědla (např. pyridin, *N*-methylimidazol). Na systém lze z principu Booleových logických bran aplikovat operátory YES, NOT a OR. Operátory YES nebo NOT lze sledovat přítomnost koordinačního rozpouštědla v roztoku (Obr. 71c, d). O jakou operaci se jedná, rozhoduje sledovaná vlnová délka – pro 670 nm platí operátor YES (Obr. 71b) a pro 725 nm platí operátor NOT (Obr. 71a). Pokud se rozhodneme sledovat fluorescenci FAM, tak lze použít operátor OR, protože fluorescence může být emitována ve třech případech – v přítomnosti antisense, pyridinu nebo obou spouštěčů (Obr. 71e, f, g).



**Obr. 71** a) graf a tabulka pravdivosti pro operátor NOT, b) graf a tabulka pravdivosti pro operátor YES, c) detail absorpčního spektra se sledovanými vlnovými délkami, d) symboly operátorů YES a NOT, e) graf a tabulka pravdivosti pro operátor OR, f) emisní spektra při studiu operátor OR, g) symbol operátoru OR.

V projektu **P2**, jsme tedy zjistili, že tvorba J-dimerů TPyzPzs nemá vliv na samotný průběh qPCR. Na druhou stranu, pokud se pro zamezení vzniku J-dimerů použije objemnější substituce zhášeče, dojde k nežádoucímu zvýšení fluorescence pozadí během experimentů. Velice zajímavou částí této práce byl popis možnosti použití sondy **FAM-ODN-7Zn** jako reportéru pro biomolekulární logické brány, což je v současné době velmi studované téma. Jedná se o úplně první zmínku o logických branách využívajících tohoto principu.

## 7 ZÁVĚR

Tato disertační práce se zabývala detailním studiem chování TPyzPzs jako univerzálních zhášečů fluorescence v ODN sondách. První kapitoly disertační práce rozebírají současný stav poznání na poli fluorescence a jejího zhášení včetně popisu používaných sond v PCR. Další kapitola pak popisuje vlastnosti a využití Pcs a AzaPcs.

Samotná kapitola týkající se výsledků a diskuse je komentovaným souborem tří prací, které vznikly během mého postgraduálního studia. První publikace **P1** navazuje na předešlou práci mých kolegů v naší výzkumné skupině a zabývá se použitím TPyzPzs jako zhášečů na dvojitě značených ODN sondách. V této práci byla srovnávána účinnost zhášení našich látek oproti komerčním zhášečům fluorescence ve vztahu k použitému fluoroforu. Z práce vyplynulo, že TPyzPz zhášeč je stejně účinný ve zhášení nehybridizované sondy jako komerční zhášeče, ale po hybridizaci je TPyzPz v účinnosti zhášení předčí. V reálných qPCR experimentech, kde se projevuje pouze účinnost zhášení nehybridizované sondy, měl TPyzPz zhášeč srovnatelné výsledky jako komerční zhášeče.

Během experimentů v této práci jsme zjistili, že dvojitě značená sonda obsahující FAM a TPyzPz vytváří unikátní agregovaný útvar, který jsme se rozhodli dále detailněji studovat, čímž vznikla publikace **P2**. Tato práce se zabývala studiem vlivu agregace FAM a TPyzPz na použití daných molekul v ODN sondách. Byly porovnávány dva TPyzPz s rozdílnou periferní substitucí, kdy jeden TPyzPz velice snadno tvořil J-dimery a druhý TPyzPz byl převážnou většinu experimentů v monomerním stavu. Výsledky tohoto projektu vedly mimo jiné k prvnímu popisu Booleových logických bran využívajících TPyzPzs.

Poslední práce **P3** popisuje syntetické postupy TPyzPzs s rozdílnými funkčními skupinami umožňující odlišnou vazbu zhášeče na ODN řetězec. Součástí této práce bylo i studium tvorby dimerů TPyzPzs v závislosti na použitých funkčních skupinách a popis ovlivnění rozpustnosti pomocí periferní substituce. Výsledky tohoto projektu byly diskutovány u jednotlivých kapitol zabývajících se danou problematikou.

## 8 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ

Přehled publikací zahrnutých v disertační práci:

**P1 Demuth, J.;** Kucera, R.; Kopecky, K.; Havlinova, Z.; Libra, A.; Novakova, V.; Miletin, M.; Zimcik, P., Efficient synthesis of a wide-range absorbing azaphthalocyanine dark quencher and its application to dual-labeled oligonucleotide probes for quantitative real-time polymerase chain reactions. *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24* (38), 9658-9666. IF<sub>2017</sub> = 5,160

*Podíl autora: charakterizace fotofyzikálních vlastností, hybridizační experimenty s ODN sondami, vyhodnocení a finalizace dat. Podíl na přípravě textu publikace.*

**P2 Demuth, J.;** Miletin, M.; Kucera, R.; Ruzicka, A.; Havlinova, Z.; Libra, A.; Novakova, V.; Zimcik, P., Self-assembly of azaphthalocyanine-oligodeoxynucleotide conjugates into J-dimers: towards biomolecular logic gates. *Org. Chem. Front.* **2020**, *7* (3), 445-456. IF<sub>2018</sub> = 5,076

*Podíl autora: příprava cílových struktur TPyzPzs, charakterizace fotofyzikálních vlastností, studium chování J-dimerů, hybridizační experimenty s ODN sondami, vyhodnocení a finalizace dat. Podíl na přípravě textu publikace.*

**P3 Demuth, J.;** Miletin, M.; Machan, M.; Kantor, M.; Zimcik, P.; Novakova, V., Synthesis and J-dimer formation of tetrapyrizinoporphyrazines with different functional groups for potential biomolecular probe applications. *ChemPlusChem* **2020**, *85* (3), 527-537. IF<sub>2018</sub> = 3,441

*Podíl autora: příprava cílových struktur TPyzPzs, charakterizace fotofyzikálních vlastností, studium chování J-dimerů, vyhodnocení a finalizace dat. Podíl na přípravě textu publikace.*



Další publikace:

Vachova, L.; Machacek, M.; Kucera, R.; **Demuth, J.**; Cermak, P.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Jedlickova, A.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P., Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)porphyrazines: a stride toward near- infrared-absorbing macrocycles. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (20), 5608-5612. IF<sub>2014</sub> = 3,562

*Podíl autora: příprava části cílových struktur.*

Machacek, M.; **Demuth, J.**; Cermak, P.; Vavreckova, M.; Hrubá, L.; Jedlickova, A.; Kubat, P.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P., Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines caught in the cationic cage: toward nanomolar active photosensitizers. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (20), 9443-9456. IF<sub>2015</sub> = 5,589

*Podíl autora: příprava části cílových struktur.*

Karlikova, M.; Cermakova, V.; **Demuth, J.**; Valer, V.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Magnesium tetrapyrizinoporphyrazines: tuning of the pK<sub>a</sub> of red-fluorescent pH indicators. *Dalton Trans.* **2019**, *48* (18), 6162-6173. IF<sub>2018</sub> = 4,052

*Podíl autora: studium fotofyzikálních vlastností.*

Kollar, J.; Machacek, M.; Halaskova, M.; Lenco, J.; Kucera, R.; **Demuth, J.**; Stekla, M.; Hasonova, K.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Cationic versus anionic phthalocyanines for photodynamic therapy: what a difference the charge makes, *J. Med. Chem.*, odesláno k posouzení. IF<sub>2018</sub> = 6,054

*Podíl autora: příprava části cílových struktur.*

Prezentace vědeckých výsledků formou ústních prezentací a posterů:

**Demuth, J.**, Kostelanský, F., Čermák, P., Nováková, V., Zimčík, P. Ústní prezentace: „Amphiphilic phthalocyanines for photodynamic therapy.“ 7. *Postgraduální a 5. postdoktorandská konference*, Hradec Králové, Česká republika, 7. - 8.2. 2017.

**Demuth, J.**, Kučera, R., Zimčík, P., Miletin, M., Nováková, V. Ústní prezentace: „New azaphthalocyanine dark quencher usable in polymerase chain reaction.“ 8. *Postgraduální a 6. postdoktorandská konference*, Hradec Králové, Česká republika, 24. - 25.1. 2018.

**Demuth, J.**, Machan, M., Kántor, M., Zimčík, P., Nováková, V. Ústní prezentace: „Supramolecular assembly of tetrapyrizinoporphyrazines into J-dimers.“ 9.

*Postgraduální a 7. postdoktorandská konference, Hradec Králové, Česká republika, 23. - 24.1. 2018.*

**Demuth, J.**, Kopecky, K., Zimcik, P., Miletin, M., Novakova, V. Poster: „Azaphthalocyanines as new quenchers for oligodeoxynucleotide probes.“ *15. Conference on Methods and Applications in Fluorescence (MAF)*, Brugy, Belgie, 10. – 13.9. 2017.

**Demuth, J.**, Kucera, R., Zimcik, P., Miletin, M., Novakova, V. Poster: „New azaphthalocyanine dark quencher usable in polymerase chain reaction“ *10. International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10)*, Mnichov, Německo, 1. – 6. 2018

**Demuth, J.**, Kantor, M., Zimcik, P., Novakova, V. Poster: „Supramolecular interaction of tetrapyrazinoporphyrazines used in oligodeoxynucleotide probes.“ *World Congress on Light and Life (17<sup>th</sup> Congress of the International Union of Photobiology and 181 Congress of the European Society for Photobiology)*, 25. – 30.8. 2019, Barcelona, Španělsko

**Demuth, J.**, Zimcik, P., Novakova, V., Poster: „Azaphthalocyanine quenchers suitable for attachment to an oligonucleotide probe.“ *Liblice 2019; 6. – 8. 11. 2019; Špindlerův Mlýn, Česká republika*

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Navarro, E.; Serrano-Heras, G.; Castano, M. J.; Solera, J., Real-time PCR detection chemistry. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *439*, 231-50.
2. Marras, S. A., Selection of fluorophore and quencher pairs for fluorescent nucleic acid hybridization probes. In *Fluorescent energy transfer nucleic acid probes*, Springer: 2006; pp 3-16.
3. Machacek, M.; Demuth, J.; Cermak, P.; Vavreckova, M.; Hrubá, L.; Jedlickova, A.; Kubat, P.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P., Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines caught in the cationic cage: toward nanomolar active photosensitizers. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (20), 9443-9456.
4. Novakova, V.; Lochman, L.; Zajicova, I.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Lang, K.; Kirakci, K.; Zimcik, P., Azaphthalocyanines: red fluorescent probes for cations. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (16), 5025-5028.
5. Novakova, V.; Laskova, M.; Vavrickova, H.; Zimcik, P., Phenol-substituted tetrapyrazinoporphyrazines: pH-dependent fluorescence in basic media. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (41), 14382-14392.
6. Miletin, M.; Zimčík, P.; Kopecký, K.; Musil, Z.; Nováková, V.; Haluza, R.; Bunčec, M., Nefluoreskující deriváty ftalocyaninů a azaftalocyaninů jako zhášecí fluorescence, 2009, *Chem. Abstr.* **2009** (152) 1148662.
7. Vachova, L.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Zimcik, P., Effect of intramolecular charge transfer on fluorescence and singlet oxygen production of phthalocyanine analogues. *Dalton Trans* **2012**, *41* (38), 11651-11656.
8. Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media: 2013.
9. Heimel, G.; Daghofer, M.; Gierschner, J.; List, E. J. W.; Grimsdale, A. C.; Mullen, K.; Beljonne, D.; Bredas, J. L.; Zojer, E., Breakdown of the mirror image symmetry in the optical absorption/emission spectra of oligo(para-phenylene)s. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122* (5), 11.
10. Sauer, M.; Hofkens, J.; Enderlein, J., *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from ensemble to single molecules*. John Wiley & Sons: 2010.
11. Henderson, B. W.; Dougherty, T. J., How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55* (1), 145-157.
12. Marras, S. A., Interactive fluorophore and quencher pairs for labeling fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Mol. Biotechnol.* **2008**, *38* (3), 247-255.
13. Boaz, H.; Rollefson, G. K., The quenching of fluorescence - deviations from the Stern Volmer law. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72* (8), 3435-3443.
14. Waring, M. J., Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13* (1), 269-282.
15. Frajji, L. K.; Hayes, D. M.; Werner, T. C., Static and dynamic fluorescence quenching experiments for the physical-chemistry laboratory. *J. Chem. Educ.* **1992**, *69* (5), 424-428.

16. Marras, S. A.; Kramer, F. R.; Tyagi, S., Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (21), e122.
17. Wu, P.; Brand, L., Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* **1994**, *218* (1), 1-13.
18. Stryer, L., Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819-46.
19. Selvin, P. R., The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7* (9), 730-734.
20. Kikuchi, K.; Sato, C.; Watabe, M.; Ikeda, H.; Takahashi, Y.; Miyashi, T., New Aspects on fluorescence quenching by molecular-oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (12), 5180-5184.
21. Aigner, D.; Borisov, S. M.; Klimant, I., New fluorescent perylene bisimide indicators - a platform for broadband pH optodes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400* (8), 2475-2485.
22. Greenfield, S. R.; Svec, W. A.; Gosztola, D.; Wasielewski, M. R., Multistep photochemical charge separation in rod-like molecules based on aromatic imides and diimides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (28), 6767-6777.
23. Tian, H.; Xu, T.; Zhao, Y. B.; Chen, K. C., Two-path photo-induced electron transfer in naphthalimide-based model compound. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, (3), 545-549.
24. Durmaz, A. A.; Karaca, E.; Demkow, U.; Toruner, G.; Schoumans, J.; Cogulu, O., Evolution of genetic techniques: past, present, and beyond. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 461524.
25. Crick, F., The double helix: a personal view. *Nature* **1974**, *248* (5451), 766-769.
26. Matthaei, J. H.; Jones, O. W.; Martin, R. G.; Nirenberg, M. W., Characteristics and composition of RNA coding units. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1962**, *48* (4), 666-677.
27. Levisky, J. M.; Singer, R. H., Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J. Cell Sci.* **2003**, *116* (14), 2833-2838.
28. Moter, A.; Gobel, U. B., Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **2000**, *41* (2), 85-112.
29. Joshi, M.; Deshpande, J., Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Int. J. Biomed. Res.* **2010**, *2* (1), 81-97.
30. Hue-Roye, K.; Vege, S., Principles of PCR-based assays. *Immunohematology* **2008**, *24* (4), 170-175.
31. McDermott, G. P.; Do, D.; Litterst, C. M.; Maar, D.; Hindson, C. M.; Steenblock, E. R.; Legler, T. C.; Jouvenot, Y.; Marrs, S. H.; Bemis, A.; Shah, P.; Wong, J.; Wang, S.; Sally, D.; Javier, L.; Dinio, T.; Han, C.; Brackbill, T. P.; Hodges, S. P.; Ling, Y.; Klitgord, N.; Carman, G. J.; Berman, J. R.; Koehler, R. T.; Hiddessen, A. L.; Walse, P.; Bousse, L.; Tzonev, S.; Hefner, E.; Hindson, B. J.; Cauly, T. H., 3rd; Hamby, K.; Patel, V. P.; Regan, J. F.; Wyatt, P. W.; Karlin-Neumann, G. A.; Stumbo, D. P.; Lowe, A. J., Multiplexed target detection using DNA-binding dye chemistry in droplet digital PCR. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (23), 11619-11627.

32. Karlsson, H. J.; Eriksson, M.; Perzon, E.; Akerman, B.; Lincoln, P.; Westman, G., Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNA-binding. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (21), 6227-6234.
33. Nam, H. M.; Srinivasan, V.; Gillespie, B. E.; Murinda, S. E.; Oliver, S. P., Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *102* (2), 161-171.
34. Garcia-Canas, V.; Cifuentes, A.; Gonzalez, R., Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44* (6), 425-436.
35. Whitcombe, D.; Theaker, J.; Guy, S. P.; Brown, T.; Little, S., Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17* (8), 804-807.
36. Stroup, S. E.; Roy, S.; McHele, J.; Maro, V.; Ntabaguzi, S.; Siddique, A.; Kang, G.; Guerrant, R. L.; Kirkpatrick, B. D.; Fayer, R.; Herbein, J.; Ward, H.; Haque, R.; Houpt, E. R., Real-time PCR detection and speciation of *Cryptosporidium* infection using Scorpion probes. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55* (9), 1217-1222.
37. Stricker, A. R.; Wilhartitz, I.; Farnleitner, A. H.; Mach, R. L., Development of a Scorpion probe-based real-time PCR for the sensitive quantification of *Bacteroides* sp ribosomal DNA from human and cattle origin and evaluation in spring water matrices. *Microbiol. Res.* **2008**, *163* (2), 140-147.
38. Di Marco, E.; Cangemi, G.; Filippetti, M.; Melioli, G.; Biassoni, R., Development and clinical validation of a real-time PCR using a uni-molecular Scorpion-based probe for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical isolates. *New Microbiol.* **2007**, *30* (4), 415-421.
39. Vytvořeno aplikací BioRender. Dostupná online – <https://biorender.com/>, Vytvořeno dne 3. 3. 2020.
40. Kiss, I.; German, P.; Sami, L.; Antal, M.; Farkas, T.; Kardos, G.; Kecskemeti, S.; Dan, A.; Belak, S., Application of real-time RT-PCR utilising LUX (light upon extension) fluorogenic primer for the rapid detection of avian influenza viruses. *Acta Vet. Hung.* **2006**, *54* (4), 525-533.
41. Nazarenko, I.; Lowe, B.; Darfler, M.; Ikononi, P.; Schuster, D.; Rashtchian, A., Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (9), e37.
42. Nordgren, J.; Bucardo, F.; Dienus, O.; Svensson, L.; Lindgren, P. E., Novel light-upon-extension real-time PCR assays for detection and quantification of genogroup I and II noroviruses in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46* (1), 164-170.
43. Osinska, E.; Golke, A.; Slonska, A.; Cymerys, J.; Banbura, M. W.; Dzieciatkowski, T., HybProbes-based real-time PCR assay for rapid detection of equine herpesvirus type 2 DNA. *Pol. J. Vet. Sci.* **2012**, *15* (3), 411-416.
44. Lim, S. Y.; Kim, B. J.; Lee, M. K.; Kim, K., Development of a real-time PCR-based method for rapid differential identification of *Mycobacterium* species. *Lett. Appl. Microbiol.* **2008**, *46* (1), 101-106.

45. Tan, W. H.; Wang, K. M.; Drake, T. J., Molecular beacons. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8* (5), 547-553.
46. Poddar, S. K., Detection of adenovirus using PCR and molecular beacon. *J. Virol. Methods* **1999**, *82* (1), 19-26.
47. Andrade, T. P. D.; Srisuvan, T.; Tang, K. F. J.; Lightner, D. V., Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (INMV). *Aquaculture* **2007**, *264* (1-4), 9-15.
48. Lucito, R.; Suresh, S.; Walter, K.; Pandey, A.; Lakshmi, B.; Krasnitz, A.; Sebat, J.; Wigler, M.; Klein, A. P.; Brune, K.; Palmisano, E.; Maitra, A.; Goggins, M.; Hruban, R. H., Copy-number variants in patients with a strong family history of pancreatic cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6* (10), 1592-1599.
49. Zhao, J. R.; Bai, Y. J.; Zhang, Q. H.; Wan, Y.; Li, D.; Yan, X. J., Detection of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using TaqMan-MGB probe technology. *World J. Gastroenterol.* **2005**, *11* (4), 508-510.
50. Stringari, C.; Abdeladim, L.; Malkinson, G.; Mahou, P.; Solinas, X.; Lamarre, I.; Brizion, S.; Galey, J. B.; Supatto, W.; Legouis, R.; Pena, A. M.; Beaurepaire, E., Multicolor two-photon imaging of endogenous fluorophores in living tissues by wavelength mixing. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 3792.
51. Lavis, L. D.; Raines, R. T., Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3* (3), 142-155.
52. Robertson, T. A.; Bunel, F.; Roberts, M. S., Fluorescein derivatives in intravital fluorescence imaging. *Cells* **2013**, *2* (3), 591-606.
53. Zhang, X. F.; Zhang, J. L.; Liu, L. M., Fluorescence properties of twenty fluorescein derivatives: lifetime, quantum yield, absorption and emission spectra. *J. Fluoresc.* **2014**, *24* (3), 819-826.
54. Armitage, B. A., Cyanine dye–DNA interactions: intercalation, groove binding, and aggregation. In *DNA Binders and Related Subjects*, Waring, M. J.; Chaires, J. B., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2005; pp 55-76.
55. Osterman, H. L.; Schutz-Geschwender, A. Near-infrared Fluorescence Imaging: Seeing Beyond the Visible with IRDye® Infrared Dyes **1993**, p. 1-18, <https://www.licor.com/documents/kkkzpho630s4rgck244ydr4i1b1fo4qx>, [citováno: 3. 4. 2020].
56. Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W., Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (3), 1130-1172.
57. Kowada, T.; Maeda, H.; Kikuchi, K., BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (14), 4953-4972.
58. Zhu, M. L.; Xing, P. P.; Zhou, Y. B.; Gong, L.; Zhang, J. H.; Qi, D. D.; Bian, Y. Z.; Du, H. W.; Jiang, J. Z., Lysosome-targeting ratiometric fluorescent pH probes based on long-wavelength BODIPY. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (27), 4422-4426.
59. Dziuba, D.; Jurkiewicz, P.; Cebecauer, M.; Hof, M.; Hocek, M., A rotational BODIPY nucleotide: an environment-sensitive fluorescence-lifetime probe for DNA interactions and applications in live-cell microscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55* (1), 174-178.

60. Ono, M.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Saji, H., BODIPY-based molecular probe for imaging of cerebral beta-amyloid plaques. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3* (4), 319-324.
61. Kapuscinski, J., DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech. Histochem.* **1995**, *70* (5), 220-233.
62. Anderson, M. T.; Baumgarth, N.; Haugland, R. P.; Gerstein, R. M.; Tjioe, T.; Herzenberg, L. A., Pairs of violet-light-excited fluorochromes for flow cytometric analysis. *Cytometry* **1998**, *33* (4), 435-444.
63. Qian, Y.; Lin, J.; Han, L. J.; Lin, L.; Zhu, H. L., A resorufin-based colorimetric and fluorescent probe for live-cell monitoring of hydrazine. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 282-286.
64. Livak, K. J.; Flood, S. J. A.; Marmaro, J.; Giusti, W.; Deetz, K., Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic-acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **1995**, *4* (6), 357-362.
65. Crisalli, P.; Kool, E. T., Multi-path quenchers: efficient quenching of common fluorophores. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (11), 2345-2354.
66. Bernacchi, S.; Mély, Y., Exciton interaction in molecular beacons: a sensitive sensor for short range modifications of the nucleic acid structure. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (13), e62.
67. Peng, X. X.; Chen, H. X.; Draney, D. R.; Volcheck, W.; Schutz-Geschwender, A.; Olive, D. M., A nonfluorescent, broad-range quencher dye for Forster resonance energy transfer assays. *Anal. Biochem.* **2009**, *388* (2), 220-228.
68. Chevalier, A.; Renard, P. Y.; Romieu, A., Straightforward synthesis of bioconjugatable azo dyes. Part 1: Black Hole Quencher-1 (BHQ-1) scaffold. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (50), 6759-6763.
69. Chevalier, A.; Renard, P. Y.; Romieu, A., Straightforward synthesis of bioconjugatable azo dyes. Part 2: Black Hole Quencher-2 (BHQ-2) and BlackBerry Quencher 650 (BBQ-650) scaffolds. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (50), 6764-6768.
70. Johansson, M. K., Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching through formation of intramolecular dimers. In *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes*, Springer: 2006; pp 17-29.
71. McKeown, N. B., *Phthalocyanine Materials: Synthesis, Structure and Function*. Cambridge University Press: Cambridge, 1998.
72. Barton, D. H. R.; Rydon, H.; Elvidge, J., Reginald Patrick Linstead, 1902-1966. *Biogr. Mem. Fell. R. Soc.* **1968**, *14*, 308-347.
73. Claessens, C. G.; Hahn, U.; Torres, T., Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications. *Chem. Rec.* **2008**, *8* (2), 75-97.
74. Donzello, M. P.; Ercolani, C.; Novakova, V.; Zimcik, P.; Stuzhin, P. A., Tetrapyrizinoporphyrazines and their metal derivatives. Part I: Synthesis and basic structural information. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *309*, 107-179.
75. George, R. D.; Snow, A. W.; Shirk, J. S.; Barger, W. R., The alpha substitution effect on phthalocyanine aggregation. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1998**, *2* (1), 1-7.

76. Kollar, J.; Machacek, M.; Jancarova, A.; Kubat, P.; Kucera, R.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Effect of bovine serum albumin on the photodynamic activity of sulfonated tetrapyrazinoporphyrazine. *Dyes Pigm.* **2019**, *162*, 358-366.
77. Demuth, J.; Kucera, R.; Kopecky, K.; Havlinova, Z.; Libra, A.; Novakova, V.; Miletin, M.; Zimcik, P., Efficient synthesis of a wide-range absorbing azaphthalocyanine dark quencher and its application to dual-labeled oligonucleotide probes for quantitative real-time polymerase chain reactions. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (38), 9658-9666.
78. Machacek, M.; Kollar, J.; Miletin, M.; Kucera, R.; Kubat, P.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P., Anionic hexadeca-carboxylate tetrapyrazinoporphyrazine: synthesis and in vitro photodynamic studies of a water-soluble, non-aggregating photosensitizer. *RSC Adv.* **2016**, *6* (12), 10064-10077.
79. Nemykin, V. N.; Lukyanets, E. A., Synthesis of substituted phthalocyanines. *Arkivoc* **2010**, 136-208.
80. Schutte, C. J. H.; Bertie, J. E.; Bunker, P. R.; Hougen, J. T.; Mills, I. M.; Watson, J. K. G.; Winnewisser, B. P., Notations and conventions in molecular spectroscopy: Part 2. Symmetry notation. *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69* (8), 1641-1649.
81. Hanack, M.; Schmid, G.; Sommerauer, M., Chromatographic separation of the four possible structural isomers of a tetrasubstituted phthalocyanine: tetrakis(2-ethylhexyloxy)phthalocyaninatonicel(II). *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32* (10), 1422-1424.
82. Grolach, B.; Dachtler, M.; Glaser, T.; Albert, K.; Hanack, M., Synthesis and separation of structural isomers of 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrasubstituted phthalocyanines. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7* (11), 2459-2465.
83. Novakova, V.; Roh, J.; Gela, P.; Kunes, J.; Zimcik, P., Azaphthalocyanines with fused triazolo rings: formation of sterically stressed constitutional isomers. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (36), 4326-4328.
84. Novakova, V.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Vachova, L.; Kopecky, K.; Lang, K.; Chábera, P.; Polívka, T., Ultrafast Intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrazines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 2555-2563.
85. Nemykin, V. N.; Dudkin, S. V.; Dumoulin, F.; Hirel, C.; Gurek, A. G.; Ahsen, V., Synthetic approaches to asymmetric phthalocyanines and their analogues. *Arkivoc* **2014**, (1), 142-204.
86. Revuelta-Maza, M. A.; Torres, T.; de la Torre, G., Synthesis and aggregation studies of functional binaphthyl-bridged chiral phthalocyanines. *Org. Lett.* **2019**, *21* (20), 8183-8186.
87. Kobayashi, N.; Ogata, H.; Nonaka, N.; Luk'yanets, E. A., Effect of peripheral substitution on the electronic absorption and fluorescence spectra of metal-free and zinc phthalocyanines. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9* (20), 5123-34.
88. Novakova, V.; Reimerova, P.; Svec, J.; Suchan, D.; Miletin, M.; Rhoda, H. M.; Nemykin, V. N.; Zimcik, P., Systematic investigation of phthalocyanines, naphthalocyanines, and their aza-analogues. Effect of the isosteric aza-replacement in the core. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (29), 13220-13233.



89. Musil, Z.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Kopecky, K.; Lenco, J., Synthesis, separation and UV/Vis spectroscopy of pyrazino-quinoxalino-porphyrazine macrocycles. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, (27), 4535-4542.
90. Novakova, V.; Donzello, M. P.; Ercolani, C.; Zimcik, P.; Stuzhin, P. A., Tetrapyrazinoporphyrazines and their metal derivatives. Part II: Electronic structure, electrochemical, spectral, photophysical and other application related properties. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *361*, 1-73.
91. Makhseed, S.; Machacek, M.; Alfadly, W.; Tuhl, A.; Vinodh, M.; Simunek, T.; Novakova, V.; Kubat, P.; Rudolf, E.; Zimcik, P., Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (95), 11149-11151.
92. Zimcik, P.; Malkova, A.; Hrubá, L.; Miletin, M.; Novakova, V., Bulky 2,6-diphenylphenylsulfanyl substituents efficiently inhibit aggregation in phthalocyanines and tetrapyrazinoporphyrazines and control their photophysical and electrochemical properties. *Dyes Pigm.* **2017**, *136*, 715-723.
93. Lo, P. C.; Huang, J. D.; Cheng, D. Y. Y.; Chan, E. Y. M.; Fong, W. P.; Ko, W. H.; Ng, D. K. P., New amphiphilic silicon(IV) phthalocyanines as efficient photosensitizers for photodynamic therapy: synthesis, photophysical properties, and in vitro photodynamic activities. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10* (19), 4831-4838.
94. Chen, Z. J.; Lohr, A.; Saha-Moller, C. R.; Wurthner, F., Self-assembled p-stacks of functional dyes in solution: structural and thermodynamic features. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 564-584.
95. Lang, K.; Mosinger, J.; Wagnerova, D. M., Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248* (3-4), 321-350.
96. Jelley, E. E., Spectral absorption and fluorescence of dyes in the molecular state. *Nature* **1936**, *138* (3502), 1009-1010.
97. Garcia-Iglesias, M.; Peuntinger, K.; Kahnt, A.; Krausmann, J.; Vazquez, P.; Gonzalez-Rodriguez, D.; Guldi, D. M.; Torres, T., Supramolecular assembly of multicomponent photoactive systems via cooperatively coupled equilibria. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (51), 19311-19318.
98. Kameyama, K.; Morisue, M.; Satake, A.; Kobuke, Y., Highly fluorescent self-coordinated phthalocyanine dimers. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44* (30), 4763-4766.
99. Novakova, V.; Zimcik, P.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Kunes, J.; Lang, K., Self-assembled azaphthalocyanine dimers with higher fluorescence and singlet oxygen quantum yields than the corresponding monomers. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, (19), 3260-3263.
100. Wurthner, F.; Kaiser, T. E.; Saha-Moller, C. R., J-aggregates: from serendipitous discovery to supramolecular engineering of functional dye materials. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50* (15), 3376-3410.
101. Turek, P.; Petit, P.; Andre, J. J.; Simon, J.; Even, R.; Boudjema, B.; Guillaud, G.; Maitrot, M., A new series of molecular semiconductors: phthalocyanine radicals. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109* (17), 5119-5122.

102. Peisert, H.; Knupfer, M.; Schwieger, T.; Auerhammer, J. M.; Golden, M. S.; Fink, J., Full characterization of the interface between the organic semiconductor copper phthalocyanine and gold. *J. Appl. Phys.* **2002**, *91* (8), 4872-4878.
103. Karimov, K. S.; Qazi, I.; Khan, T. A.; Draper, P. H.; Khalid, F. A.; Mahroof-Tahir, M., Humidity and illumination organic semiconductor copper phthalocyanine sensor for environmental monitoring. *Environ. Monit. Assess.* **2008**, *141* (1-3), 323-328.
104. Terao, Y.; Sasabe, H.; Adachi, C., Correlation of hole mobility, exciton diffusion length, and solar cell characteristics in phthalocyanine/fullerene organic solar cells. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90* (10), 3.
105. Kumar, C. V.; Sfyri, G.; Raptis, D.; Stathatos, E.; Lianos, P., Perovskite solar cell with low cost Cu-phthalocyanine as hole transporting material. *RSC Adv.* **2015**, *5* (5), 3786-3791.
106. Martinez-Diaz, M. V.; de la Torre, G.; Torres, T., Lighting porphyrins and phthalocyanines for molecular photovoltaics. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (38), 7090-7108.
107. de la Torre, G.; Vaquez, P.; Agullo-Lopez, F.; Torres, T., Role of structural factors in the nonlinear optical properties of phthalocyanines and related compounds. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (9), 3723-3750.
108. Oluwole, D. O.; Yagodin, A. V.; Mkhize, N. C.; Sekhosana, K. E.; Martynov, A. G.; Gorbunova, Y. G.; Tsivadze, A. Y.; Nyokong, T., First example of nonlinear optical materials based on nanoconjugates of sandwich phthalocyanines with quantum dots. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (12), 2820-2830.
109. Pearson, A. J.; Plint, T.; Jones, S. T. E.; Lessard, B. H.; Credginton, D.; Bender, T. P.; Greenham, N. C., Silicon phthalocyanines as dopant red emitters for efficient solution processed OLEDs. *J. Mater. Chem. C* **2017**, *5* (48), 12688-12698.
110. Hohnholz, D.; Steinbrecher, S.; Hanack, M., Applications of phthalocyanines in organic light emitting devices. *J. Mol. Struct.* **2000**, *521*, 231-237.
111. Sharman, W. M.; Allen, C. M.; van Lier, J. E., Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today* **1999**, *4* (11), 507-517.
112. Lukyanets, E. A., Phthalocyanines as photosensitizers in the photodynamic therapy of cancer. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1999**, *3* (6-7), 424-432.
113. Kumawat, L. K.; Mergu, N.; Singh, A. K.; Gupta, V. K., A novel optical sensor for copper ions based on phthalocyanine tetrasulfonic acid. *Sens. Actuators, B* **2015**, *212*, 389-394.
114. Koga, H.; Nishimori, Y.; Tonegawa, N.; Sakurai, S., Electrophotographic toner containing phthalocyanine colorant and image-forming apparatus, JP2011112989A, 2011, *Chem. Abstr.* **2011** (155) 717861.
115. Tadokoro, K.; Shoshi, M.; Namba, M., Tetrapyrazinoporphyrazine compound and electrophotographic photoreceptor containing it as charge-generating substance, JP11166129A, 1999, *Chem. Abstr.* **1999** (131) 394722.
116. Gregory, P.; Foster, C. E., Composition containing an azaphthalocyanine and use in ink-jet printing inks and ink cartridges, WO2002034844A1, 2002, *Chem. Abstr.* **2002** (136) 332281.

117. Abdel-Razik, H. H.; El-Sayed, S.; Hassen, A., Dielectric properties of new fully conjugated 2H-and metal-pyrazinoporphyrazine network polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *121* (6), 3579-3589.
118. Lochman, L.; Zimcik, P.; Klimant, I.; Novakova, V.; Borisov, S. M., Red-emitting CO<sub>2</sub> sensors with tunable dynamic range based on pH-sensitive azaphthalocyanine indicators. *Sens. Actuators, B* **2017**, *246*, 1100-1107.
119. Dini, D.; Hanack, M.; Meneghetti, M., Nonlinear optical properties of tetrapyrazinoporphyrazinato indium chloride complexes due to excited-state absorption processes. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (26), 12691-12696.
120. Ohta, K.; Azumane, S.; Kawahara, W.; Kobayashi, N.; Yamamoto, I., Discotic liquid crystals of transition metal complexes. Part 26: Supramolecular structures of long-chain-substituted octaphenyltetrapyrazinoporphyrazine derivatives. *J. Mater. Chem.* **1999**, *9* (10), 2313-2320.
121. Korzhenevskii, A. B.; Efimova, S. V.; Zelenov, A. A.; Koifman, O. I., Metal complexes of polymeric tetrapyrazinoporphyrazine of the network structure: III. Catalytic properties. *Russ. J. Gen. Chem.* **2006**, *76* (5), 822-825.
122. Maizlish, V.; Korzhenevskii, A.; Klyuev, V., Metal complexes of tetrapyrazinoporphyrazines - effective catalysts of the oxidation of mercaptans. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1984**, *20* (9), 1031-1033.
123. Zimcik, P.; Miletin, M.; Kostka, M.; Schwarz, J.; Musil, Z.; Kopecky, K., Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol., A* **2004**, *163* (1-2), 21-28.
124. Mitzel, F.; FitzGerald, S.; Beeby, A.; Faust, R., The synthesis of arylalkyne-substituted tetrapyrazinoporphyrazines and an evaluation of their potential as photosensitisers for photodynamic therapy. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, (5), 1136-1142.
125. Viola, E.; Donzello, M. P.; Testani, S.; Luccisano, G.; Astolfi, M. L.; Rizzoli, C.; Cong, L.; Mannina, L.; Ercolani, C.; Kadish, K. M., Tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines with peripherally appended pyridine rings. 19. pentanuclear octa(2-pyridyl)tetrapyrazinoporphyrazines carrying externally carboranthiolate groups: physicochemical properties and potentialities as anticancer drugs. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (2), 1120-1133.
126. Lochman, L.; Svec, J.; Roh, J.; Novakova, V., The role of the size of aza-crown recognition moiety in azaphthalocyanine fluorescence sensors for alkali and alkaline earth metal cations. *Dyes Pigm.* **2015**, *121*, 178-187.
127. Lochman, L.; Machacek, M.; Miletin, M.; Uhlirova, S.; Lang, K.; Kirakci, K.; Zimcik, P.; Novakova, V., Red-emitting fluorescence sensors for metal cations: the role of counteranions and sensing of SCN<sup>-</sup> in biological materials. *ACS Sens.* **2019**, *4* (6), 1552-1559.
128. Karlikova, M.; Cermakova, V.; Demuth, J.; Valer, V.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Magnesium tetrapyrazinoporphyrazines: tuning of the pK<sub>a</sub> of red-fluorescent pH indicators. *Dalton Trans.* **2019**, *48* (18), 6162-6173.

129. Cidlina, A.; Miletin, M.; Fathi-Rasekh, M.; Nemykin, V. N.; Zimcik, P.; Novakova, V., OFF-ON-OFF red-emitting fluorescent indicators for a narrow pH window. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (8), 1795-1804.
130. Kopecky, K.; Novakova, V.; Miletin, M.; Kucera, R.; Zimcik, P., Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron* **2011**, *67* (33), 5956-5963.
131. Demuth, J.; Miletin, M.; Kucera, R.; Ruzicka, A.; Havlinova, Z.; Libra, A.; Novakova, V.; Zimcik, P., Self-assembly of azaphthalocyanine-oligodeoxynucleotide conjugates into J-dimers: towards biomolecular logic gates. *Org. Chem. Front.* **2020**, *7* (3), 445-456.
132. Libra, A.; Ferneti, C.; Lorusso, V.; Visigalli, M.; Anelli, P. L.; Staud, F.; Tiribelli, C.; Pascolo, L., Molecular determinants in the transport of a bile acid-derived diagnostic agent in tumoral and nontumoral cell lines of human liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *319* (2), 809-817.
133. Schweitzer, C.; Schmidt, R., Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (5), 1685-1757.
134. Makhseed, S.; Tuhl, A.; Samuel, J.; Zimcik, P.; Al-Awadi, N.; Novakova, V., New highly soluble phenoxy-substituted phthalocyanine and azaphthalocyanine derivatives: Synthesis, photochemical and photophysical studies and atypical aggregation behavior. *Dyes Pigm.* **2012**, *95* (2), 351-357.
135. Kaestner, L.; Cesson, M.; Kassab, K.; Christensen, T.; Edminson, P. D.; Cook, M. J.; Chambrier, I.; Jori, G., Zinc octa-*n*-alkyl phthalocyanines in photodynamic therapy: photophysical properties, accumulation and apoptosis in cell cultures, studies in erythrocytes and topical application to Balb/c mice skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2* (6), 660-667.
136. Michelsen, U.; Kliesch, H.; Schnurpfeil, G.; Sobbi, A. K.; Wohrle, D., Unsymmetrically substituted benzonaphthoporphyrines: A new class of cationic photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64* (4), 694-701.
137. Ogunsipe, A.; Maree, D.; Nyokong, T., Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives. *J. Mol. Struct.* **2003**, *650* (1-3), 131-140.
138. Zimcik, P.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Uslu Kobak, R. Z.; Svandrlikova, E.; Váchová, L.; Lang, K., Magnesium azaphthalocyanines: an emerging family of excellent red-emitting fluorophores. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (7), 4215-4223.
139. Inaba, Y.; Kobuke, Y., Synthesis of a complementary dimer from mono(imidazolyl)-substituted cobalt(II) porphyrin as a new artificial T-form hemoglobin. *Tetrahedron* **2004**, *60* (13), 3097-3107.
140. Kollar, J.; Machacek, M.; Halaskova, M.; Lenco, J.; Kucera, R.; Demuth, J.; Stekla, M.; Hasonova, K.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P., Cationic versus anionic phthalocyanines for photodynamic therapy: what a difference the charge makes. *J. Med. Chem.*, odesláno k posouzení.

141. Vachova, L.; Machacek, M.; Kucera, R.; Demuth, J.; Cermak, P.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Jedlickova, A.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P., Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (20), 5608-5612.
142. Kopecky, K.; Novakova, V.; Miletin, M.; Plistilova, L.; Berka, P.; Zimcik, P., Synthesis and properties of azaphthalocyanines with 1,2,3,4-tetrahydropyrazino[2,3-b]pyrazine moiety. *Macroheterocycles* **2011**, *4* (3), 171-176.
143. Li, Z.; Yazaki, R.; Ohshima, T., Chemo- and regioselective direct functional group installation through catalytic hydroxy group selective conjugate addition of amino alcohols to a,b-unsaturated sulfonyl compounds. *Org. Lett.* **2016**, *18* (14), 3350-3353.
144. Galakatos, N. G.; Kemp, D. S., New S-protection from known N-protection: thio esters of *N*-urethanyl-*N*-methyl- $\gamma$ -aminobutyric acid as a class of protective groups for thiols in peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (8), 1302-1304.
145. Huang, J. H.; Wen, W. H.; Sun, Y. Y.; Chou, P. T.; Fang, J. M., Two-stage sensing property via a conjugated donor-acceptor-donor constitution: application to the visual detection of mercuric ion. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (15), 5827-5832.
146. Liu, W.; Jensen, T. J.; Fronczek, F. R.; Hammer, R. P.; Smith, K. M.; Vicente, M. G. H., Synthesis and cellular studies of nonaggregated water-soluble phthalocyanines. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (4), 1033-1041.
147. Ng, A. C. H.; Li, X. Y.; Ng, D. K. P., Synthesis and photophysical properties of nonaggregated phthalocyanines bearing dendritic substituents. *Macromolecules* **1999**, *32* (16), 5292-5298.
148. Miguel García-Iglesias. *Sistemas multifuncionales de tipo molecular, polimérico y supramolecular basados en ftalocianinas*. Disertační práce. Madrid: Universidad Autonoma de Madrid, Facultad de ciencias, **2011**, 345 s.
149. Fajari, L.; Fors, P.; Lang, K.; Nonell, S.; Trull, F. R., Intramolecular and intermolecular photoinduced electron transfer in isomeric mesoporphyrin nitrobenzyl esters: structure and solvent effects. *J. Photochem. Photobiol., A* **1996**, *93* (2-3), 119-128.
150. Katz, E., Boolean logic gates realized with enzyme-catalyzed reactions - unusual look at usual chemical reactions. *ChemPhysChem* **2019**, *20* (1), 9-22.
151. Erbas-Cakmak, S.; Kolemen, S.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; James, T. D.; Yoon, J.; Akkaya, E. U., Molecular logic gates: the past, present and future. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (7), 2228-2248.

## 10 SEZNAM PŘÍLOH

Jedná se o soubor publikovaných prací **P1-3** v impaktovaných časopisech. Práce jsou řazeny chronologicky, dle data publikace.

- P1** Demuth, J.; Kucera, R.; Kopecky, K.; Havlinova, Z.; Libra, A.; Novakova, V.; Miletin, M.; Zimcik, P., Efficient synthesis of a wide-range absorbing azaphthalocyanine dark quencher and its application to dual-labeled oligonucleotide probes for quantitative real-time polymerase chain reactions. *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24* (38), 9658-9666. IF<sub>2017</sub> = 5,160
- P2** Demuth, J.; Miletin, M.; Kucera, R.; Ruzicka, A.; Havlinova, Z.; Libra, A.; Novakova, V.; Zimcik, P., Self-assembly of azaphthalocyanine-oligodeoxynucleotide conjugates into J-dimers: towards biomolecular logic gates. *Org. Chem. Front.* **2020**, *7* (3), 445-456. IF<sub>2018</sub> = 5,076
- P3** Demuth, J.; Miletin, M.; Machan, M.; Kantor, M.; Zimcik, P.; Novakova, V., Synthesis and J-dimer formation of tetrapyrazinoporphyrazines with different functional groups for potential biomolecular probe applications. *ChemPlusChem* **2020**, *85* (3), 527-537. IF<sub>2018</sub> = 3,441

## **Příloha P1**

**Demuth, J.;** Kucera, R.; Kopecky, K.; Havlinova, Z.; Libra, A.; Novakova, V.; Miletin, M.; Zimcik, P., Efficient synthesis of a wide-range absorbing azaphthalocyanine dark quencher and its application to dual-labeled oligonucleotide probes for quantitative real-time polymerase chain reactions. *Chem. – Eur. J.* **2018**, *24* (38), 9658-9666. IF<sub>2017</sub> = 5,160





## **Příloha P2**

**Demuth, J.**; Miletin, M.; Kucera, R.; Ruzicka, A.; Havlinova, Z.; Libra, A.; Novakova, V.; Zimcik, P., Self-assembly of azaphthalocyanine-oligodeoxynucleotide conjugates into J-dimers: towards biomolecular logic gates. *Org. Chem. Front.* **2020**, 7 (3), 445-456.  
IF<sub>2018</sub> = 5,076



### **Příloha P3**

**Demuth, J.;** Miletin, M.; Machan, M.; Kantor, M.; Zimcik, P.; Novakova, V., Synthesis and J-dimer formation of tetrapyrazinoporphyrazines with different functional groups for potential biomolecular probe applications. *ChemPlusChem* **2020**, *85* (3), 527-537.

IF<sub>2018</sub> = 3,441