

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Fluorescenční vlastnosti chelirubinu v interakci s DNA

Martin Palkovský

Přerov 2012



STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

2011/2012

34. ročník

Obor: 03 – Chemie

Fluorescenční vlastnosti chelirubinu v interakci s DNA

*Fluorescence properties of chelirubine in an
interaction with DNA*

Autor: Martin Palkovský
Novostavby 251, Majetín, 751 03

Škola: 2. ročník
Gymnázium Jakuba Škody, Přerov, Komenského 29,
750 11

Konzultant: Mgr. Petr Táborský Ph.D.
Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie
Masarykova univerzita, Brno

Místo vypracování: Přírodovědecká fakulta, Ústav chemie
Masarykova univerzita, Brno

Přerov 2012



Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracoval samostatně, použil jsem pouze podklady citované v práci a uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování práce je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Přerově dne 29. 2. 2012

podpis:.....

Poděkování:

Rád bych poděkoval konzultantovi práce Mgr. Petru Táborskému Ph.D. za ochotu, trpělivost, velké množství věnovaného času, věcné i formální připomínky, a za skvělé pracovní prostředí. Dále bych chtěl poděkovat Ústavu chemie Masarykovy univerzity a projektu *Otevřená věda*, v jehož rámci byla práce vypracovávána, a Lékařské fakultě Masarykovy univerzity za poskytnutí alkaloidu.

Anotace:

Byly zkoumány fluorescenční vlastnosti kvartérního benzo[c]fenanthridinového alkaloidu (KBA) chelirubinu v přítomnosti různých forem oligonukleotidů dvojšroubovicové DNA.

Klíčová slova: DNA, fluorescence, fluorescenční vlastnosti, chelirubin, KBA

Annotation:

Fluorescence properties of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloid (QBA) chelirubine were studied in presence of different structures of oligonucleotides of double-stranded DNA.

Key words: DNA, fluorescence, fluorescence properties, chelirubine, QBA

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	Luminiscence	11
3.2	Fotoluminiscence	12
3.3	Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy	14
3.3.1	<i>Struktura KBA</i>	14
3.3.2	<i>Vlastnosti KBA</i>	15
3.3.3	<i>Biosyntéza KBA</i>	17
3.4	DNA	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Instrumentace	26
4.2	Seznam použitých chemikálií	27
4.3	Příprava roztoků	28
	Příprava 0,4 M roztoku fosfátového pufru o pH 6,2	28
	Příprava 1,24 M roztoku chloridu sodného NaCl	28
	Příprava $7,2 \cdot 10^{-4}$ M roztoku KBA chelirubinu $C_{21}H_{18}NO_5$ –	28
	Příprava roztoků DNA	28
	Příprava zřed'ovacího roztoku R5	28
	Příprava roztoků ke studiu interkalace CHR s GC12	29
	Příprava roztoků pro stanovení LOD metody interkalace CHR s GC12	29
	Příprava roztoků ke studiu komplexu CHR a GC12 Jobovou titrací	29
	Příprava roztoků pro stanovení LOD metody interkalace CHR s AT12	30
	Příprava roztoků ke studiu komplexu CHR a AT12 Jobovou titrací	30
	Příprava roztoků ke studiu komplexu CHR s Dickerson12 Jobovou titrací	31
	Příprava roztoků pro studium faktorů ovlivňující fluorescence chelirubinu	31
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
5.1	Interakce CHR s DNA GC12	34
5.2	LOD metody interkalace CHR s DNA GC12	35
5.3	Studium komplexu KBA chelirubinu s DNA GC12 Jobovou titrací (JT)	36
5.4	Interakce CHR s DNA A6T6	37
5.5	Studium komplexu KBA chelirubinu s DNA Dickerson12 JT	38

5.6	LOD metody interkalace CHR s DNA GC12 a studium tohoto komplexu JT	39
5.7	Studium faktorů ovlivňujících fluorescenci chelirubinu	40
5.8	Souhrnné výsledky	43
6	PŘÍLOHY	45
6.1	Použité symboly	45
7	REFERENCE.....	46

1 ÚVOD

Alkaloidy jsou nízkomolekulární sekundární rostlinné metabolity bazického charakteru, které ve své molekule obvykle obsahují atom dusíku vázaný nejčastěji ve formě heterocyklu nebo primárního, sekundárního, případně terciárního aminu.^{1,2} V přírodě se vyskytují hlavně v rostlinách ve formě solí přítomných organických kyselin. Nachází se ve všech jejích částech, zejména v semenech a kořenech. Rostliny obvykle obsahují směs alkaloidů podobné, pro rostlinu typické, struktury.² Vznikají aminací meziproductů při biosyntéze terpenů, purinů, steroidů a některých kyselin.³

Význam alkaloidů dosud není zcela objasněn, většina odborníků se domnívá, že slouží jako jedna z rostlinných rezerv dusíku,¹ podílí se na některých biosyntézách a mají ochrannou funkci, jsou totiž většinou toxické.² Některé z nich mají i nezanedbatelné léčebné účinky (např.: antimalarikum a antiarytmikum chinin,⁴ anticholinergikum atropin dříve užívaný k léčbě Parkinsonovy choroby,⁵ v dnešní lékařské praxi se používá k odstranění křečí hladké svaloviny, při otravách organofosfáty⁶,...).

Chelirubin patří mezi pentasubstituované kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA). Jedná se o alkaloidy isochinolinového typu. Skupina isochinolinových alkaloidů je jednou ze strukturně nejrozmanitějších skupin alkaloidů vůbec, jsou biogeneticky odvozené od tyrosinu.⁷

KBA jsou poměrně malá skupina alkaloidů, které jsou na první pohled nápadné svým výrazným zbarvením. Jeví velice zajímavé vlastnosti při fluorescenční spektrometrii. Jejich zbarvení i schopnost fluoreskovat je způsobena heterocyklickými strukturami v molekule s elektron-donorovými substituenty obsahující kyslík (-OH, -OCH₃, -OCH₂O-) vázanými na uhlíkatý skelet, tzv. *chromofory*.⁸ KBA se obvykle projevují v žluté a červené spektrální oblasti. Dosud jich bylo izolováno patnáct, kromě artefaktů a syntetických derivátů.

KBA se vyskytují v řadě rostlinných druhů čeledí *Papaveraceae* (mákovité), *Fumariaceae* (zemědýmuvité) a *Rutaceae* (routovité).⁹ V ČR roste jen jediná rostlina, ze které se dají izolovat KBA a to *Chelidonium majus* (vlastovičník větší).

Ačkoliv mají KBA významné antiproliferační, antiapoptické, antimikrobiální a antiflogistické účinky, nejsou v moderním lékařství příliš využívané, některé z nich

byly přidávány do zubní pasty u nás konkrétně do pasty *Santoin*, která je patentově chráněna.¹⁰ V tradičním čínském lékařství se však KBA používají již od pradávna k léčbě revmatické artritidy, bolesti zubů a v chirurgii.¹¹

První izolované KBA byly chelerythrin (CHE) a sanguinarin (SA) byly objeveny již v 19. století, SA roku 1827 z rostliny *Sanguinaria canadensis* izoloval James Dana¹², CHE roku 1839 z rostliny *Chechdomum majus* izoloval Probst. Tyto alkaloidy jsou dodnes jedinými komerčně dostupnými alkaloidy. Ve letech 1954 – 1960 izolovali Slavík se Slavíkovou několik minoritních KBA: chelirubin (CHR), a chelilutin (CHL) z *Chechdomum majus*¹³ a ze *Sanguinaria canadensis*¹⁴ sanguilutin (SL) a sanguirubin (SR).

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo prozkoumat fluorescenční vlastnosti chelirubinu v interakci s různými strukturami DNA a popsat změny fluorescenčních spekter v závislosti na druhu použité DNA.

Dalším cílem práce bylo určit limity detekce takto vzniklých komplexních sloučenin a prostudovat strukturu těchto komplexů metodou Jobovy titrace a určit tak stechiometrický poměr mezi ligandem (alkaloidem) a DNA.

Posledním stanoveným cílem byla snaha objasnit změnu fluorescence alkaloidu v DNA a prostudovat, jaké faktory na ni mají vliv.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Luminiscence

Luminiscence je jev, kdy atomy, případně molekuly, absorbují energii, kvůli tomu elektrony nabývají vyšší energie (excitují se) a posunují se do vyšších nestabilních kvantových rovin, k stabilizaci elektronů do původních kvantových hladin dochází vyzářením energie ve formě světla, pokud se jedná o fotoluminiscenci, tak λ_{exc} nabývá jiných hodnot než λ_{em} .

Význam luminiscence v poslední době vzrůstá, jelikož se jedná o velice citlivou a všestranně využitelnou metodu. Dá se použít i k bližšímu určení struktury látek. Sloučeniny, které projevují luminiscenci, jsou většinou organického původu, jsou ale známy i látky původu anorganického. Tyto látky se nazývají luminofory.

Podle způsobu absorpce energie, můžeme luminiscenci rozdělit do několika kategorií.

Typy luminiscence:¹⁵

Fotoluminiscence – zdrojem energie je světlo

Elektroluminiscence – zdrojem energie je elektrický proud

Termoluminiscence – zdrojem energie je tepelná energie

Radioluminiscence – zdrojem energie je radioaktivní záření

Triboluminiscence – zdrojem energie je mechanická energie

Chemiluminiscence – zdrojem energie je chemická reakce

Bioluminiscence – zdrojem energie jsou biochemické pochody

...

V dnešní době se v analytické praxi nejvíce využívá vlastností fotoluminiscence.

3.2 Fotoluminiscence

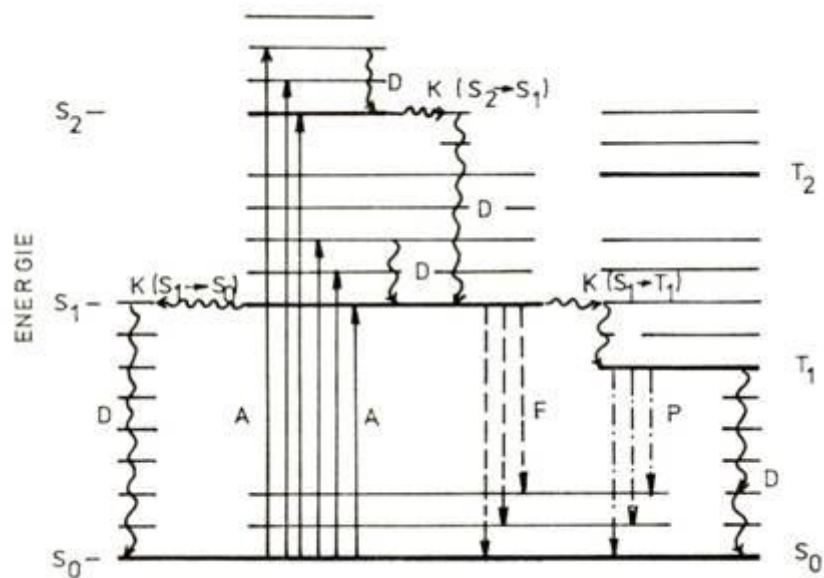
Díky působení záření o vhodné vlnové délce dochází k excitaci molekuly ze základního stavu S_0 na některou z vyšší kvantových hladin S_1 anebo S_2 . Jelikož jsou excitované stavy nestabilní, mají tendenci vracet se zpět do energeticky chudšího základního stavu S_0 , rozdíl v energiích kvantových hladin je pak buď vyzářen ve formě fotonů, nebo dochází k sérii vibračních a rotačních pohybů, kdy excitované elektrony narážejí do okolních molekul a částečně jim předávají svou energii. Tento děj se nazývá *nezářivý přechod*, energie se při něm uvolňuje ve formě tepla.¹⁶

Procesy, kdy dochází k emisi fotonů v průběhu přechodů mezi kvantovými hladinami, jsou dva – *fluorescence* a *fosforescence*. Oba procesy se liší mechanismem přechodu excitovaných elektronů a tím pádem i délkou jednotlivých dějů.¹⁷

Při fluorescenci se v excitovaném orbitalu nachází dva elektrony o opačném spinu. Po excitaci se pak oba elektrony vrací ze singletových stavů S_1 a S_2 do základního stavu S_0 , v průběhu tohoto děje dochází k emisi fotonů. Obvykle je vlnová délka emisního záření vyšší než excitačního záření, to je způsobeno rotačními a vibračními posuny, kdy dochází k uvolňování energie. Doba trvání fluorescence se pohybuje mezi 10^{-7} a 10^{-9} s.¹⁸

Při fosforescenci dochází k emisi fotonů z tripletového stavu T_1 , kde se vyskytují dva elektrony se stejným spinem. Při excitaci, kdy přechází elektrony ze singletového stavu S_1 do tripletového stavu T_1 , dochází k převrácení spinu jednoho z elektronů a vzniku metastabilního stavu o dvou excitovaných elektronech stejného spinu. Po excitaci dochází k přechodu do nejnižší energetické hladiny tripletového stavu T_1 vibračními pochody a pak opět k převrácení spinu jednoho z elektronů – důsledek Pauliho vylučovacího principu. Z tohoto důvodu je fosforescence v porovnání s fluorescencí delší proces – trvá řádově 10^{-2} až sekundy.¹⁸

Proces emise elektronů a vibračních pohybů schematicky znázorňuje *Jablonského diagram* (viz **Obr. 1**).



Obrázek 1: Jablonského diagram

A – absorpce záření

F – fluorescence

P – fosforescence

D – vibrační pohyby a nezářivý přechod

3.3 Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy

Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA) jsou řazeny mezi isocholinové alkaloidy.²⁰ KBA se vyskytují v řadě rostlinných druhů čeledi *Papaveraceae*, *Fumariaceae* a *Rutaceae*.⁹ KBA se používají v tradiční medicíně, podstatné uplatnění nalézají hlavně v čínském léčitelství, kde se používaly např. k léčbě revmatu. Jejich účinky jsou v posledních letech prokazovány lékařskými studii. Mezi jejich významné účinky patří antiapoptické, antimikrobiální a antiflogistické účinky. Bylo také dokázáno, že jeví antiproliferační účinky vůči rakovinovým buňkám aktivací a uvolněním kaspáz.²¹ Protinádorová aktivita je způsobována jejich interakcí s DNA. Bylo prokázáno, že UkrainTM, semisystematický derivát chelidoninu, působí proti rozličné škále buněčných linií rakovinných buněk.²² V České republice byly KBA přidávány do zubní pasty *Santoin*, která je patentově chráněna.¹⁰

Ačkoliv je většina alkaloidů dostupná pouze extrakcí z rostlin, některé z nich mohou být uměle chemicky připraveny. Jedinými komerčně dostupnými alkaloidy jsou chelerythrin, nitidin a sanguinarin.

3.3.1 Struktura KBA

KBA se v rostlinách vyskytují téměř vždy ve formě solí, to je způsobeno jejich interakcí s přítomnými kyselinami. Základem jejich struktury je tetracyklický skelet, tzv. *N*-methylbenzo[c]fenanthridinový kation (viz **Schéma 1**). Nejreaktivnější vazbou v molekule je iminová vazba C=N⁺ mezi atomem dusíku v poloze pět a atomem uhlíku v poloze 6. Dusík nese methylovou skupinu a je kladně polarizován.

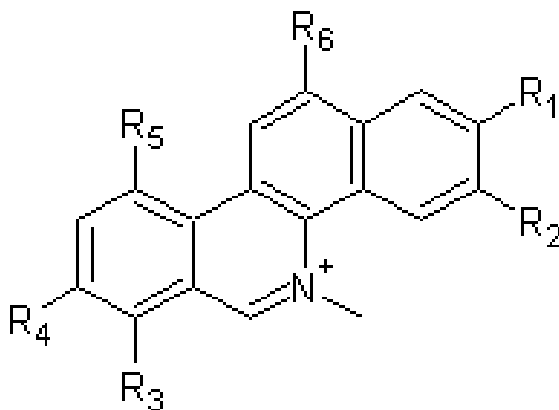


Schéma 1: N-methylbenzo[c]fenanthridinový kation

Struktury základních KBA jsou uvedeny v **Tabulce 1**.

Alkaloid	Zkratka	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Sanguinarin	SA	-OCH ₂ O-		-OCH ₂ O-		-H	-H
Chelerythrin	CHE	-OCH ₂ O-		-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H
Chelirubin	CHR	-OCH ₂ O-		-OCH ₂ O-		-H	-H
Chelilutin	CHL	-OCH ₂ O-		-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H
Sanguirubin	SR	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₂ O-		-H	-H
Makarpin	MA	-OCH ₂ O-		-OCH ₂ O-		-H	-H
Sanguilutin	SL	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H

Tabulka 1: Poloha substituentů jednotlivých KBA

Vodíkové atomy vázané na aromatických jádrech alkaloidu jsou substituovány elektron-donorovými skupinami -OH, -OCH₃ a -OCH₂O-. Substituenty mohou být vázány v pozicích 2, 3, 8, 9, 10 a 12. Podle polohy substituentů KBA rozdělujeme do čtyř podkupin: ⁹

- 2,3,7,8-tetrasubstituované alkaloidy – sanguinarin, chelerythrin, fagaridin, isofagaridin
- 2,3,8,9-tetrasubstituované alkaloidy – nitidin, avicin, fagaronin
- Pentasubstituované alkaloidy – sanguilutin, sanguirubin, chelirubin, chelilutin, 10-hydroxysanguinarin, 10-hydroxychelerythrin
- Hexasubstituované alkaloidy – makarpin, 12-hydroxychelirubin

3.3.2 Vlastnosti KBA

Iminová vazba je velmi citlivá vůči nukleofilnímu ataku, proto jsou vlastnosti KBA závislé na pH roztoku, s jeho změnami dochází i ke změnám struktury. Vyskytují se ve dvou základních formách – kvartérní neboli iminové formě a ve formě alkanolaminu neboli pseudobáze. Změny v chemické struktuře jsou popsány na **Schématu 2**.

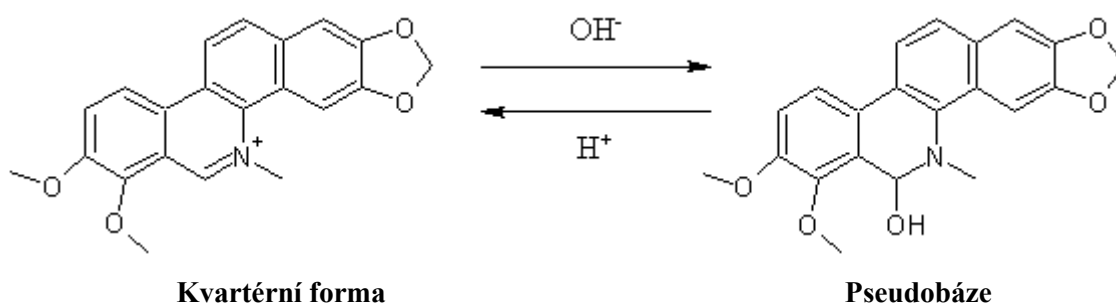


Schéma 2: Přechod mezi kvartérní formou a pseudobází

Mezi formami dochází k ustanovení rovnováhy, které popisují konstanty pK_a . Jejich hodnoty se pohybují v rozmezí 7,70 (chelirubin) – 9,00 (chelerythrin).²³ Z toho vyplývá, že v kyselých prostředích převládá kladně nabitá látka – iminová forma –, zatímco v prostředích se zásaditým pH dochází k transformaci na pseudobázi.²⁰

Pseudobáze i iminová forma se liší svými vlastnostmi. Iminová forma je snadno rozpustná ve vodě, je obvykle výrazně barevná a díky polarizovanému dusíku snadno proniká skrz buněčné membrány a účastní se tak biologických jevů.²⁴ Naopak pseudobáze je nepolární, obvykle nebarevná a málo rozpustná až nerozpustná ve vodě. Při vysokých hodnotách pH dochází ke kondenzaci dvou molekul pseudobází (viz **Schéma 3**).⁹

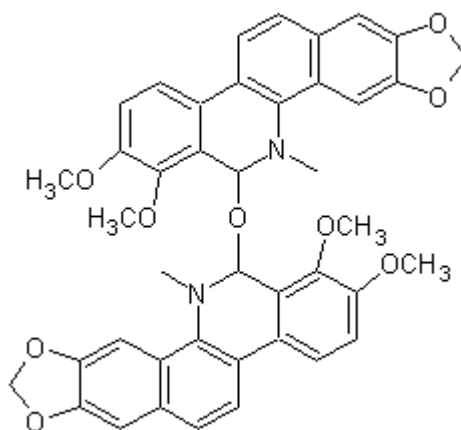


Schéma 3: Produkt kondenzace chelerythrinových pseudobází za vysokého pH

3.3.3 Biosyntéza KBA

Jako prekursor KBA při biosyntézách byl považován (S)-retikulin, což bylo potvrzeno Farnsworthem.²⁵ Další výzkum směřoval k zjištění dalších prekurzorů. Pomocí nuklidového značení sloučenin a později jejich nasazením do enzymaticky katalyzovaných reakcí bylo zjištěno, že dalším prekursorem je (S)-norkoklaurin, který vzniká Pitet-Spenglerovou kondenzací dopaminu a 4-hydroxyfenylacetaldehydu. Vznik těchto látek je geneticky odvozován od tyrosinu.²⁶ Biosyntéza retikulinu je popsána na **Schématu 4**.

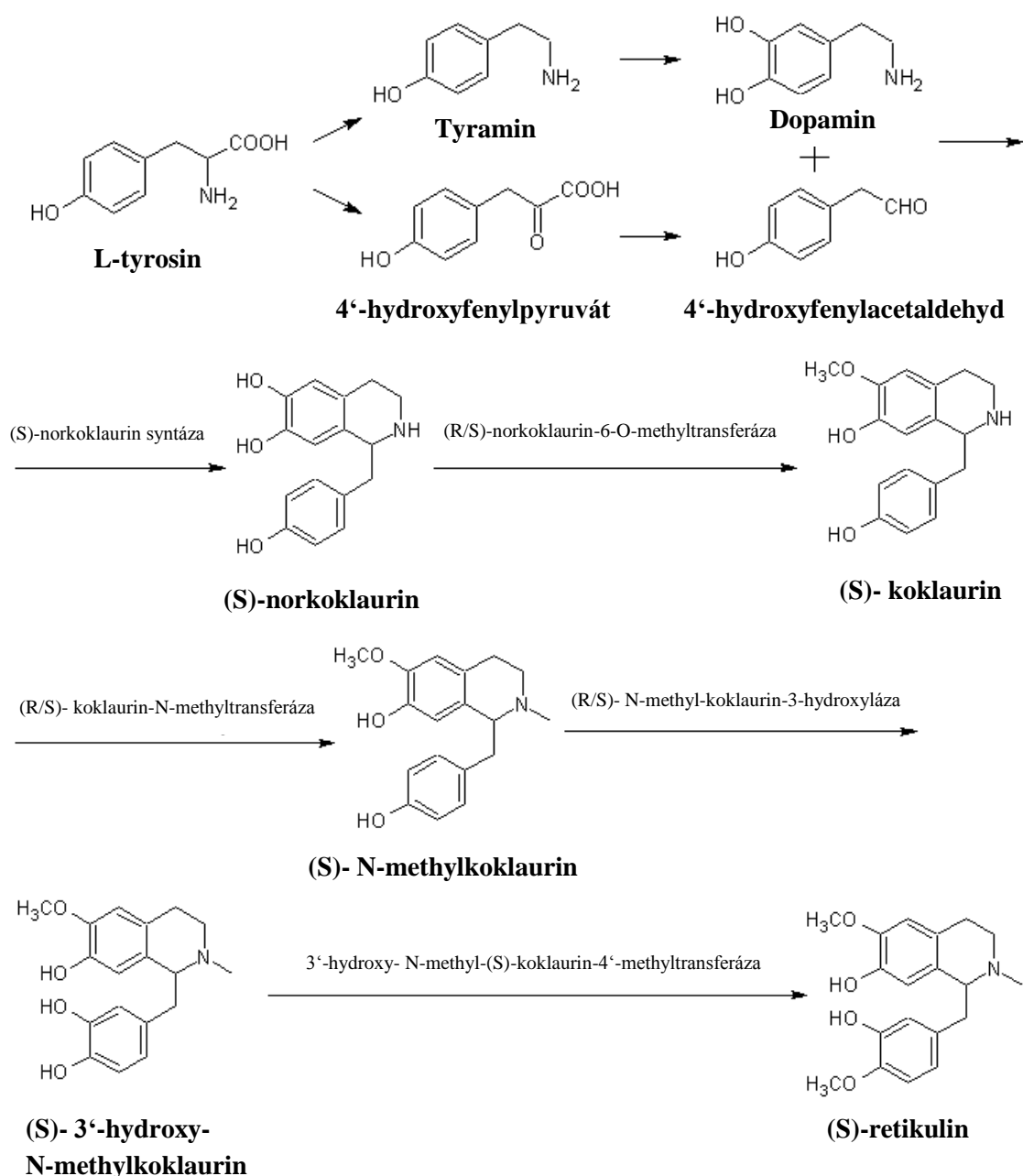


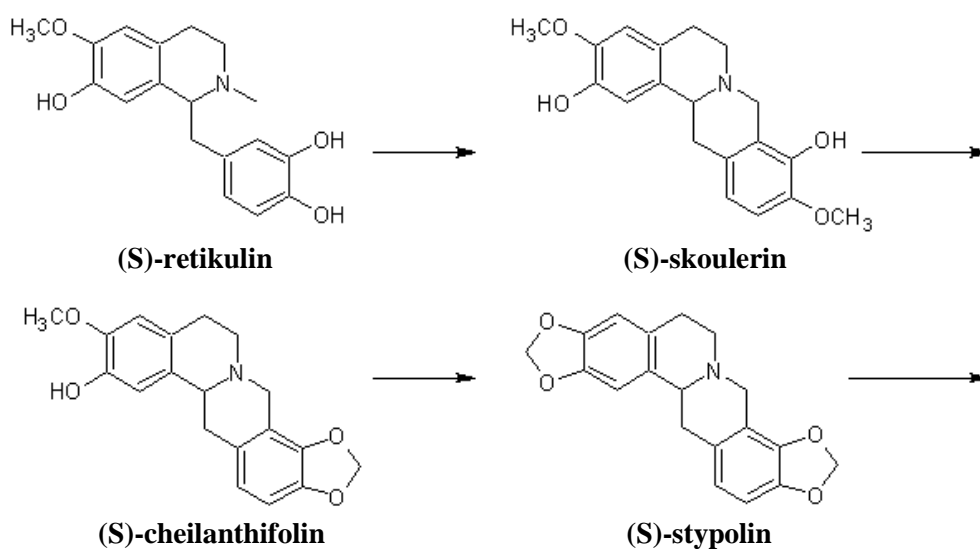
Schéma 4: Biosyntéza S-retikulinu

Ze **Schématu 4** vyplývá, že enzymy (S)-norkoklaurinsyntasa a 3'-hydroxy-N-methyl-(S)-koklaurin-4'-O-methyltransferáza jsou přísně stereoselektivní, ostatní již ne.

Biosyntézou KBA z (S)-retikulinu se v minulosti zabýval Zenk²⁷, který popsal enzymatické transformace vedoucí k dihydrosanguinarinu, 10-hydroxydihydrosanguinarinu, dihydrochelirubinu, 12-hydroxydihydrochelirubinu a dihydromakarpinu. Jeho výsledky znázorňuje **Schéma 5**.

Pomocí BBE dochází ke konverzi N-methylové skupiny (S)-retikulinu na methylenový můstek, čímž dochází k cyklizaci a vzniká tak (S)-skoulerin. Působením P450-dependentních oxidáz dochází k cyklizaci methoxy- a hydroxy- skupin v terminálních oblastech alkaloidu za vzniku methylenedioxy- skupin. Primárně tedy vzniká (S)-cheilanthifolin a jeho další přeměnou pak (S)-stypolin. Poté dochází k N-methylaci (S)-stypolinu (S)-tetrahydroprotoberberin-*cis*-N-methyltransferázou za vzniku (S)-*cis*-N-methylstypolinu.

(S)-*cis*-N-methylstypolin pak vystupuje jako substrát pro další P450-dependentní hydroxylázu, dochází k narušení vazby mezi atomem dusíku a atomem uhlíku C-6 a oxidaci substrátu v poloze C-6 za vzniku protopinu. Po otočení nedusíkaté části molekuly a cyklizaci vzniká dihydrosanguinarin. Pomocí P450-dependentních hydroxyláz postupně vznikají 10-hydroxydihydrosanguinarin, dihydrochelilutin, 12-hydroxydihydrochelilutin a dihydromakarpin, které jsou pak příslušnými P450-dependentními monooxygenázami a O-methyltransferázou přeměněny na finální KBA.



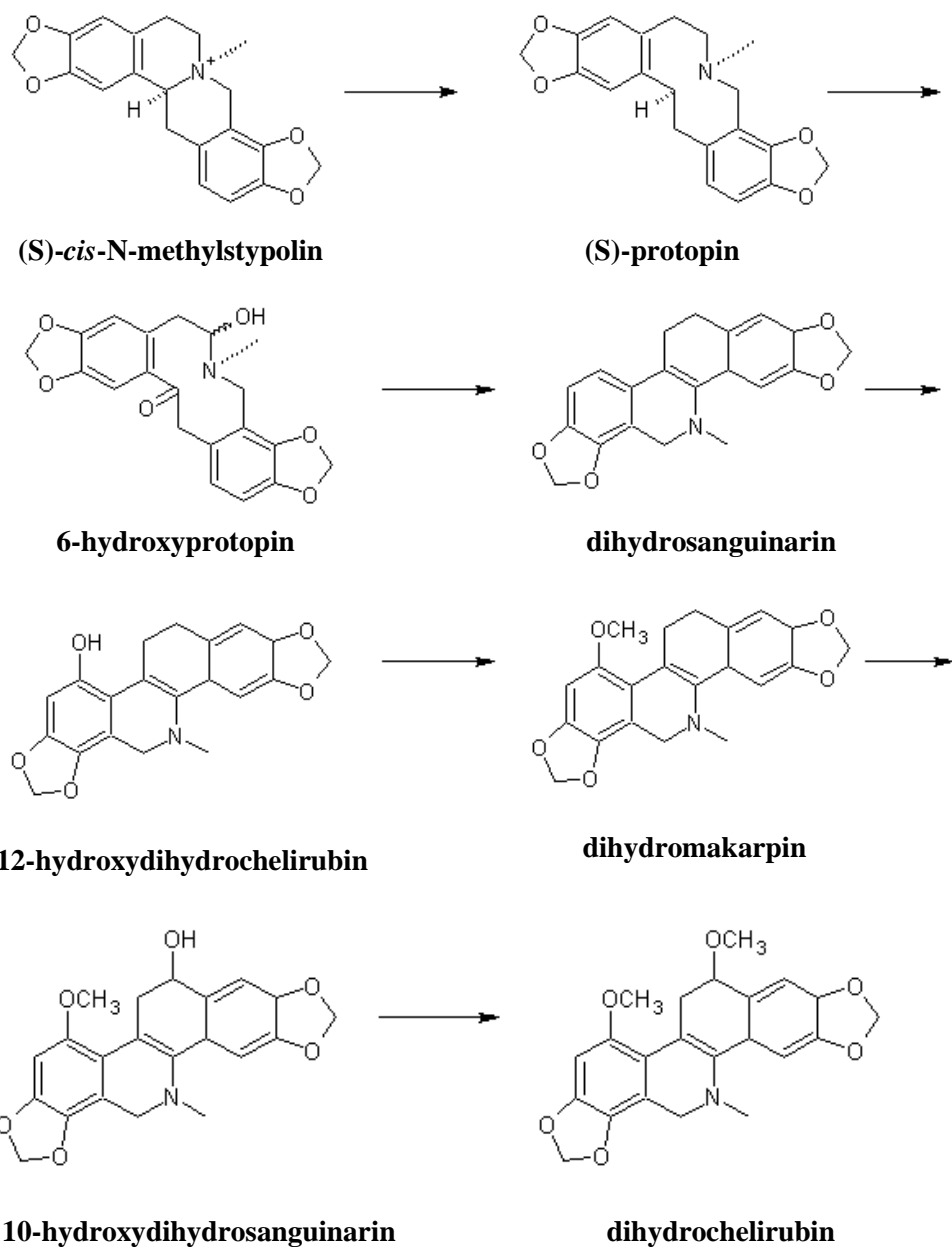
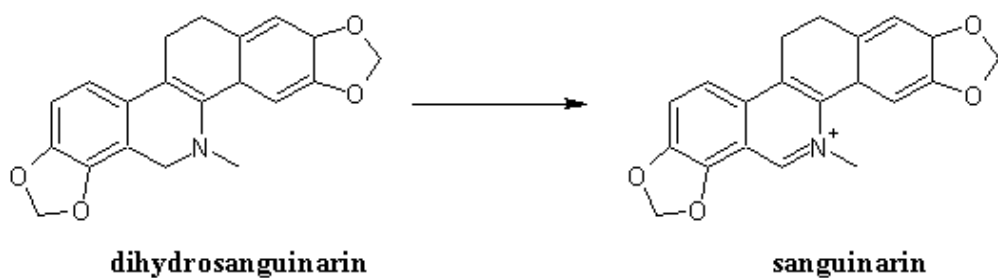


Schéma 5: Schéma biosyntézy k dihydroaduktům KBA

Zenkův další výzkum se zaměřil na zjištění enzymatických procesů vedoucích přímo ke KBA (viz **Schéma 6**), výsledky uveřejnil ve stejné publikaci.



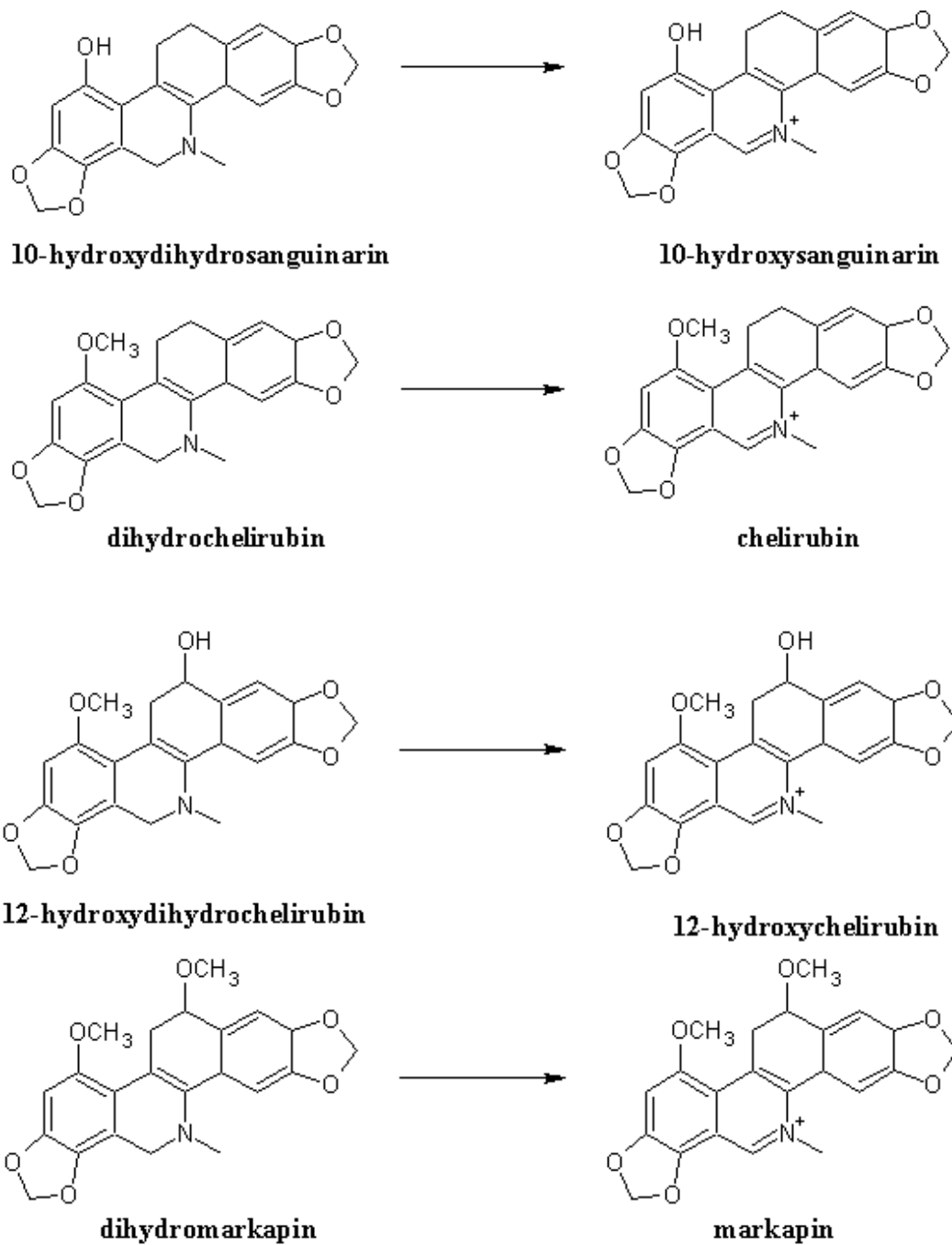


Schéma 6: Dehydrogenace na výsledné alkaloidy

3.4 DNA

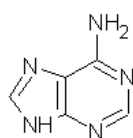
DNA neboli deoxyribonukleová kyselina je jednou z nukleových kyselin a zároveň je nositelem genetické informace u všech živých organismů (s výjimkou několika nebuněčných, u kterých tuto funkci zastává RNA). DNA řídí syntézu RNA, tzn., že prostřednictvím rRNA i syntézu proteinů.

V prokaryotických buňkách se vyskytuje ve formě monomolekulárního cyklického nukleoidu volně se nacházejícího v cytosolu. U eukaryot se nachází již více druhů DNA, u živočišných buněk se vyskytuje v jádře a jako mDNA v mitochondriích, u rostlinných buněk se navíc vyskytuje jako pDNA v plastidech.

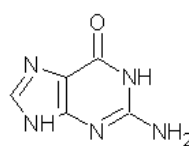
Jako první byla DNA izolována švýcarským lékařem Friedrichem Miescherem^{1,28} z jader leukocytů izolovaných z hnisajících ran pacientů. Na počátku 20. století pak bylo Phoebem Levenem zjištěno, že se skládá ze sacharidické, fosfátové a bazické složky.²⁹ Tvar DNA byl popsán až roku 1953 Watsonem a Crickem, za tento objev obdrželi roku 1963 Nobelovu cenu.³⁰

DNA se skládá ze tří složek. Nejdůležitější z nich je dusíkaté báze, jsou čtyři druhy (dva purinové a dva pyrimidinové). Druhou z nich je sacharidická složka – 2-deoxy-D-ribose. Třetí a poslední složkou je pak složka fosfátová zastoupená ve formě fosfátového aniontu PO_4^{3-} . Struktury dusíkatých bází jsou uvedeny na **Schématu 7**.

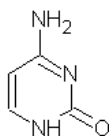
Spojení báze se sacharidickou složkou se nazývá *nukleosid*.³¹



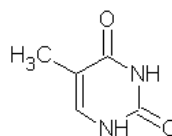
Adenin



Guanin



Cytosin



Thymin

Schéma 7: Struktury dusíkatých bází tvořících DNA

DNA má obvykle α -helikální tvar a je složena ze dvou antiparalelních polynukleotidových řetězců. Tyto řetězce jsou vystavěny pomocí fosfodiesterových vazeb mezi atomem uhlíku 5' jednoho sacharidu a atomem uhlíku 3' druhého sacharidu – tím vzniká 5'-3' orientovaný *nukleotid*. Jelikož jsou řetězce antiparalelní, jeden se točí ve směru 5'-3' a druhý ve směru 3'-5', tím se vytváří tvar α -helixu. Řetězec je stabilizován pomocí vodíkových vazeb a dalších nízkoenergetickým intermolekulárních interakcí mezi paralelními bázemi.^{2,32,33} Adenin se páruje s thyminem a cytosin se páruje s guaninem. Párování zásad je schematicky ukázáno na **Schématu 8**.

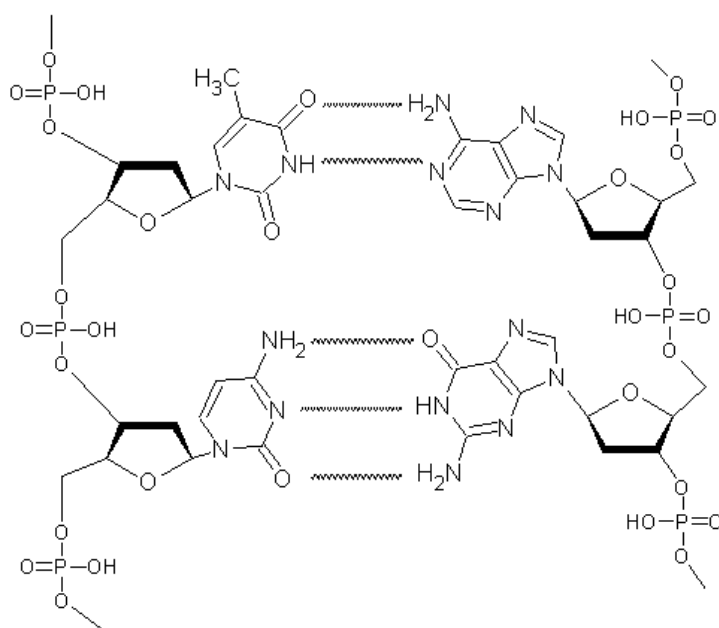


Schéma 8: Schematické znázornění párování bází v DNA

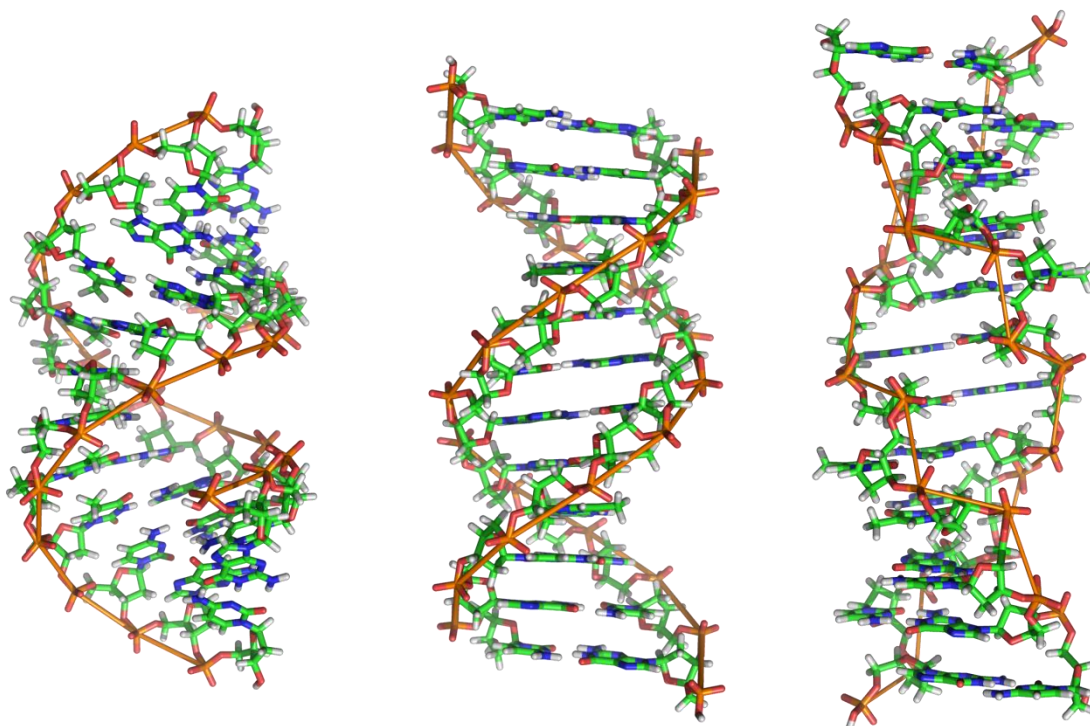
Podle sekundární struktury ji rozlišujeme do tří hlavních dvouřetězcových geoforem.

A-typ je chirálně pravotočivá DNA, která vzniká reformací B-typu při snížení zastoupení vody v prostředí pod 75 %.³⁴ Vzestup páru k ose činí 2,55 Å (0,25 nm) a jejich počet na závit činí 11, svírají s osou úhel 32,7°.³⁵ V každém závitě se vyskytuje velký a malý žlábek, u A-typu je velký žlábek stejně hluboký jako žlábek malý.³⁶

B-typ je nejčastějším typem DNA, který za normálních podmínek převažuje. Chiralitou je rovněž pravotočivý jako A-typ, je však užší a vzestup na pár je rapidnější – 3,4 Å (0,34 nm). Páry jsou k ose více nakloněny, svírají úhel 6° a na jeden závit jich připadá v průměru 10,5. Blíží se k Watson-Crickovu modelu DNA.³⁴ Velký žlábek je hluboký, malý žlábek je mělký.³⁶

Z-*typ* je chirálně levotočivá DNA. Tvar Z-*typu* je nepravidelný a nazývá se *cikcak*.³⁶ Význam Z-*typu* není zcela jasný, usuzuje se, že pomáhá při transkripci DNA. Průměrný počet párů bází na jeden závit je 12, jejich vzestup k ose 3,7 Å (0,37 nm) a svírají s ní úhel 7°. Z-*typ* lze vytvořit z A- i B-*typů* použitím 0,7 M chloridu hořečnatého nebo 2,5 M chloridu sodného.³⁶

Geoformy jsou zobrazeny na **Obr. 2**.



Obrázek 2: Struktury charakteristických řetězců DNA, zleva: A-*typ*, B-*typ*, Z-*typ*¹

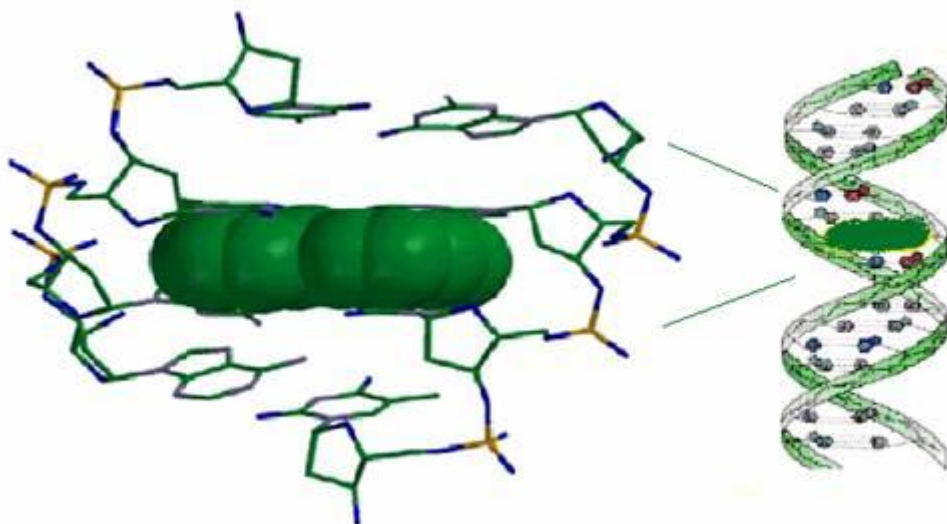
Interakce KBA s DNA

V zásadě existují tři druhy nekovalentní interakce ligandu (v tomto případě KBA) s dsDNA. Prvním případem je spojení ligandu s fosfátovým aniontem, ligand je pak připojen k DNA po jejím okraji. Velice vzácné může dojít k navázání ligandu do velkého žlábkku DNA. Nejčastějším typem interakce je však mechanismus *interkalace*, která se uplatňuje i u interakce DNA s KBA.

Pojem interkalace neboli vmezeření byl poprvé použit roku 1961 při popisu silných vazebných interakcí mezi ligandem (některými heteroatomickými barvivy) a nukleové kyseliny (obzvláště pak DNA).¹

Aby ligand mohl interkalovat mezi báze DNA, je třeba, aby splňoval několik podmínek: musí být planární, heteroaromatický a musí být polarizován. U KBA tyto podmínky splňuje pouze iminová báze. Alkanolaminy, kde není atom dusíku polarizován, tedy nejsou schopny interkalovat.

Interkalace se na struktuře KBA projeví změnou některých jejích fyzikálních vlastností. Primárně dochází k mírnému rozpletení dsDNA v oblastech interkalace, což může mít za následek inhibici některých enzymů, jako jsou topoisomerázy^{37,38} a jiné enzymy působící na DNA například při replikaci a transkripci,¹ zpevnění struktury - její stabilizaci, rozšíření a prodloužení.¹⁶ K interkalaci dochází hlavně u B-typu dsDNA a přednostně mezi páry bází C-G.¹ Schematický mechanismus interkalace je uveden na **Obr. 3**.



Obrázek 3: Schematické znázornění interkalace ligandu do dsDNA⁷

Schopnost KBA interkalovat do DNA závisí na druhu substituentů vázaných v polohách C7 a C8, iontové síle roztoku a výše zmíněném druhu bází. Výzkum interkalace KBA byl v minulosti podpořen v důsledku jejich struktury velice podobné fenanthridinům (ethidium bromid – EB, propidium jodid – PI,...), které se dnes používají v klinické praxi pro značení buněčných jader pomocí mechanismu interkalace.²³ Struktury EB a PI jsou uvedeny na **Schématu 9**.

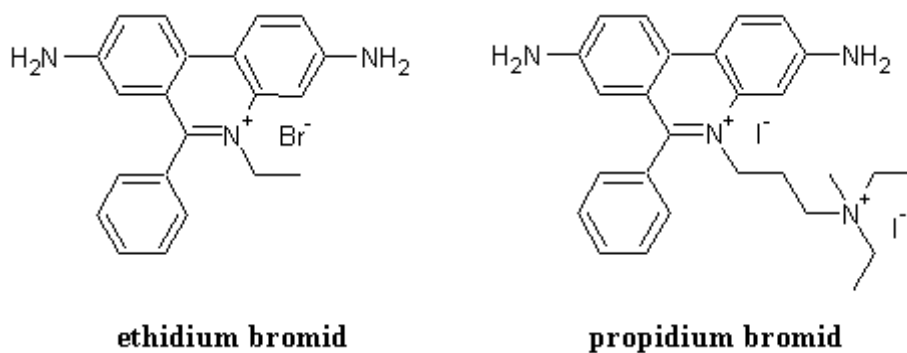


Schéma 9: Struktury fluorochromů ethidium bromidu a propidium jodidu

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Instrumentace

Spektrofluorimetr AMINCO – Bowman Series 2 (Thermo Spectronic, USA)

• Parametry přístroje:

- Xenonová kontinuální lampa 150 W
- Xenonová záblesková lampa 7 W
- Rozsah vlnových délek 180 – 850 nm
- Rychlost snímání 3 – 6000 nm · min⁻¹
- Přesnost vlnové délky ± 0,5 nm
- Opakovatelnost měření ± 0,25 nm
- Ovládací program AB-2



Obrázek 4: Spektrofluorimetr AMINCO – Bowman Series 2³⁹

K změření hodnot pH se použil pH-metr Orion 720 A (Thermo Electron, USA).



Obrázek 5: pH-metr Orion 720 A⁴⁰

4.2 Seznam použitých chemikálií

- Dihydrogenfosforečnan sodný $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p. a., Merck, Německo
- Hydroxid sodný NaOH , p. a., Merck, Německo
- Cyklohexan C_6H_{12} , p. a., Merck, Německo
- Benzen C_6H_6 , p. a., Merck, Německo
- Ethanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, p. a. Merck, Německo
- Chelirubin $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{NO}_5^+$, poskytnuto LF MU, Brno
- Guanin $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$, poskytnuto Ústavem chemie MU
- Chlorid sodný NaCl , p. a., Lachema, Česká republika
- A6T6 (5'-AAA AAA TTT TTT-3'), Thermo Fisher scientific, Německo
- AT12 (5'-ATA TAT ATA TAT-3'), Thermo Fisher scientific, Německo
- GC12 (5'-GCG CGC GCG CGC-3'), Thermo Fisher scientific, Německo
- Dickerson12 (5'-GCG CAA TTG CGC-3'), Thermo Fisher scientific, Německo

4.3 Příprava roztoků

Příprava 0,4 M roztoku fosfátového pufru o pH 6,2

Na analytických vahách se s přesností na čtyři desetinná místa odvážilo 6,2408 g dihydrogenfosforečnanu sodného $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, který byl kvantitativně přenesen do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. pH roztoku bylo upravováno přidáváním koncentrovaného roztoku NaOH, aby dosáhlo výsledné hodnoty 6,2, bylo kontrolováno pH-metrem Orion.

Příprava 1,24 M roztoku chloridu sodného NaCl

Na analytických vahách se s přesností na čtyři desetinná místa odvážilo 7,2469 g chloridu sodného NaCl, který byl kvantitativně přenesen do odměrné baňky o objemu 100 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. Tento roztok zajišťoval při měřeních konstantní iontovou sílu.

Příprava $7,2 \cdot 10^{-4}$ M roztoku KBA chelirubinu $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{NO}_5^-$

KBA chelirubin poskytla LF MU v Brně navážený v práškové formě. CHR byl pouze rozpuštěn v daném množství vody, aby měl roztok koncentraci $7,2 \cdot 10^{-4}$ M.

Příprava roztoků DNA

DNA byla dodána výrobcem ve formě prášků o dané hmotnosti. Podle dodacího listu se do každého oligonukleotidu přidalo uvedené množství vody.

Výsledná koncentrace závisela na typu oligonukleotidu:

- Koncentrace roztoku GC12 byla $1,1 \cdot 10^{-4}$ M
- Koncentrace roztoku AT12 byla $1,8 \cdot 10^{-4}$ M
- Koncentrace roztoku A6T6 byla $1,0 \cdot 10^{-4}$ M
- Koncentrace roztoku Dickerson12 byla $1,8 \cdot 10^{-4}$ M

Příprava zředovacího roztoku R5

Do plastové nádoby o objemu 10 000 μl se postupně v tomto pořadí odpipetovalo: 6883 μl destilované vody, 600 μl 0,4M fosfátového pufru (výsledná koncentrace 0,03 M), 484 μl 1,24 M roztoku NaCl (výsledná koncentrace 0,075 M) a 33 μl $7,2 \cdot 10^{-4}$ M alkaloidu CHR (výsledná koncentrace $3 \cdot 10^{-6}$ M).

Příprava roztoků ke studiu interkalace CHR s GC12

Do křemenné kyvety o hraně 1 cm a objemu 700 μl se postupně v tomto pořadí odpipetovalo: 492 μl destilované vody, 53 μl 0,4 M roztoku fosfátového pufru (výsledná koncentrace 0,03 M), 42 μl 1,24 M roztoku NaCl (výsledná koncentrace 0,075 M), 84 μl $1,1 \cdot 10^{-4}$ M roztoku GC12 (výsledná koncentrace $6,0 \cdot 10^{-6}$ M), poté se nechal roztok odstát, aby se oligonukleotid mohl zformovat do tvaru dsDNA, a po pěti minutách bylo přidáno 29 μl CHR (výsledná koncentrace $3,0 \cdot 10^{-6}$ M).

Mezi jednotlivými měřeními bylo z kyvety odebíráno 100 μl , 200 μl anebo 300 μl roztoku a namísto toho se přidávalo 100 μl , 200 μl anebo 300 μl roztoku R5, který zaručoval konstantní koncentraci fosfátového pufru, NaCl a CHR, ale postupně snižoval koncentraci GC12.

Příprava roztoků pro stanovení LOD metody interkalace CHR s GC12

Byl použit speciální roztok GC12, který byl připraven postupným odpipetováním 1196,3 μl destilované vody, 105 μl 0,4 M fosfátového pufru, 84,7 μl 1,24 M NaCl a 14 μl $3 \cdot 10^{-6}$ M GC12. Výsledná koncentrace roztoku GC12 byla $5,7 \cdot 10^{-7}$ M. Roztok zahříván po dobu 5 minut na 95 $^{\circ}\text{C}$.

Byl použit speciální roztok CHR, který vznikl odpipetováním 75 μl $7,2 \cdot 10^{-4}$ M CHR do 675 μl destilované vody, výsledná koncentrace roztoku byla $7,2 \cdot 10^{-5}$.

Do keramické kyvety o hraně 1 cm a objemu 700 μl se postupně v tomto pořadí odpipetovalo: 258 μl destilované vody, 24,9 μl 0,4 M roztoku fosfátového pufru, 20,1 μl 1,24 M roztoku NaCl, 367,4 μl $5,7 \cdot 10^{-7}$ M roztoku GC12 (výsledná koncentrace $3,0 \cdot 10^{-7}$ M), poté se nechal roztok odstát, aby se oligonukleotid mohl zformovat do tvaru dsDNA, a po pěti minutách bylo přidáno 29,3 μl $7,2 \cdot 10^{-5}$ M roztoku CHR (výsledná koncentrace $3 \cdot 10^{-6}$ M).

Pro každé měření byl připraven nový roztok. Koncentrace CHR ($3 \cdot 10^{-6}$ M), fosfátového pufru (0,03 M) a NaCl (1,24 M) byla vždy stejná a to, koncentrace oligonukleotidu se permanentně snižovala.

Příprava roztoků ke studiu komplexu CHR a GC12 Jobovou titrací

Byl použit speciální roztok GC12, který byl připraven postupným odpipetováním: 4869,2 destilované vody, 461,5 μl 0,4 M roztoku fosfátového pufru, 354,3 μl 1,24 M roztoku NaCl a 314,9 μl $1,1 \cdot 10^{-4}$ M roztoku GC12. Koncentrace GC12 v připraveném roztoku je $3,0 \cdot 10^{-6}$ M.

Byl použit speciální roztok CHR, který byl připraven postupným odpipetováním: 6825,2 μl destilované vody, 615,4 μl 0,4 M roztoku fosfátového pufru, 354,3 μl 1,24 M roztoku NaCl a 87,0 μl $2,8 \cdot 10^{-4}$ M roztoku CHR. Koncentrace CHR v připraveném vzorku je $3,0 \cdot 10^{-6}$ M.

Do kyvety byly připravovány vždy nové roztoky. Každý roztok byl připraven smíšením obou zásobních roztoků v určitém poměru.

Příprava roztoků pro stanovení LOD metody interkalace CHR s AT12

Byl použit speciální roztok AT12, který vznikl odpipetováním 48 μl $7,2 \cdot 10^{-4}$ M CHR do 432 μl destilované vody. Výsledná koncentrace roztoku byla $5,7 \cdot 10^{-7}$ M.

Byl použit speciální roztok CHR, který vznikl odpipetováním 75 μl $7,2 \cdot 10^{-4}$ M CHR do 675 μl vody, výsledná koncentrace roztoku byla $7,2 \cdot 10^{-5}$.

Do keramické kyvety o hraně 1 cm a objemu 700 μl se postupně v tomto pořadí odpipetovalo: 258 μl destilované vody, 24,9 μl 0,4 M roztoku fosfátového pufru, 20,1 μl 1,24 M roztoku NaCl, 367,4 μl $1,1 \cdot 10^{-4}$ M roztoku AT12 (výsledná koncentrace $3,0 \cdot 10^{-07}$ M), poté se nechal roztok odstát, aby se oligonukleotid mohl zformovat do tvaru dsDNA, a po pěti minutách bylo přidáno 29,3 μl $5,7 \cdot 10^{-7}$ M roztoku CHR (výsledná koncentrace $3 \cdot 10^{-6}$ M).

Pro každé měření byl připraven nový roztok. Koncentrace CHR ($3 \cdot 10^{-6}$ M), fosfátového pufru (0,03 M) a NaCl (1,24 M) byla vždy stejná a to, koncentrace oligonukleotidu se permanentně snižovala.

Příprava roztoků ke studiu komplexu CHR a AT12 Jobovou titrací

Byl použit speciální roztok AT12, který byl připraven postupným odpipetováním: 3319,6 μl destilované vody, 307,7 μl 0,4 M roztoku fosfátového pufru, 236,2 μl 1,24 M roztoku NaCl a 136,5 μl $1,8 \cdot 10^{-4}$ M roztoku AT12. Koncentrace AT12 v připraveném roztoku je $3,0 \cdot 10^{-6}$ M.

Byl použit speciální roztok CHR, který byl připraven postupným odpipetováním: 3412,6 μl destilované vody, 307,7 μl 0,4 M roztoku fosfátového pufru, 236,2 μl 1,24 M roztoku NaCl a 43,5 μl $2,8 \cdot 10^{-4}$ M roztoku CHR. Koncentrace CHR v připraveném vzorku je $3,0 \cdot 10^{-6}$ M.

Do kyvety byly připravovány vždy nové roztoky. Každý roztok byl připraven smíšením obou zásobních roztoků v určitém poměru.

Příprava roztoků ke studiu komplexu CHR s Dickerson12 Jobovou titrací

Byl použit speciální roztok Dickerson12, který byl připraven postupným odpipetováním: 3319,6 μl destilované vody, 307,7 μl 0,4 M roztoku fosfátového pufru, 236,2 μl 1,24 M roztoku NaCl a 136,5 μl $1,8 \cdot 10^{-4}$ M roztoku Dickerson12. Koncentrace Dickerson12 v připraveném roztoku je $3,0 \cdot 10^{-6}$ M.

Byl použit speciální roztok CHR, který byl připraven postupným odpipetováním: 3412,6 μl destilované vody, 307,7 μl 0,4 M roztoku fosfátového pufru, 236,2 μl 1,24 M roztoku NaCl a 43,5 μl $2,8 \cdot 10^{-4}$ M roztoku CHR. Koncentrace CHR v připraveném vzorku je $3,0 \cdot 10^{-6}$ M.

Do kyvety byly připravovány vždy nové roztoky. Každý roztok byl připraven smíšením obou zásobních roztoků v určitém poměru.

Příprava roztoků pro studium faktorů ovlivňující fluorescence chelirubinu

Fosfátový roztok chelirubinu byl připraven postupným odpipetováním 595 μl fosfátového pufru ($c = 0,4$ M, $\text{pH} = 6,2$) a 5 μl $2,8 \cdot 10^{-4}$ M chelirubinu. Výsledná koncentrace chelirubin v roztoku byl $1,97 \cdot 10^{-4}$ M.

Cyklohexanový roztok chelirubin byl připraven postupným odpipetováním 595 μl cyklohexanu a 5 μl $2,8 \cdot 10^{-4}$ M chelirubinu. Výsledná koncentrace chelirubinu byl $1,97 \cdot 10^{-4}$ M. V důsledku nemísitelnosti vody a cyklohexanu došlo k protřepání směsi, vzniku emulze a následnému převedení organického podílu do cyklohexanové fáze.

Benzenový roztok chelirubin byl připraven postupným odpipetováním 595 μl benzenu a 5 μl $2,8 \cdot 10^{-4}$ M chelirubinu. Výsledná koncentrace chelirubinu byl $1,97 \cdot 10^{-4}$ M. V důsledku nemísitelnosti vody a benzenu došlo k protřepání směsi, vzniku emulze a následnému převedení organického podílu do benzenové fáze.

Ethanolový roztok chelirubin byl připraven postupným odpipetování 595 μl etanolu a 5 μl $2,8 \cdot 10^{-4}$ M chelirubinu. Výsledná koncentrace chelirubin v roztoku byla $1,97 \cdot 10^{-4}$ M.

Bylo použito 495 μl guaninového roztoku roztok ($c = 3 \cdot 10^{-6}$ M), který byl smíchán se 100 μl fosfátového pufru ($c = 0,4$ M, $\text{pH} = 6,2$) a 5 μl $2,8 \cdot 10^{-4}$ M roztoku chelirubinu. Výsledná koncentrace chelirubinu byla $1,97 \cdot 10^{-6}$ M).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

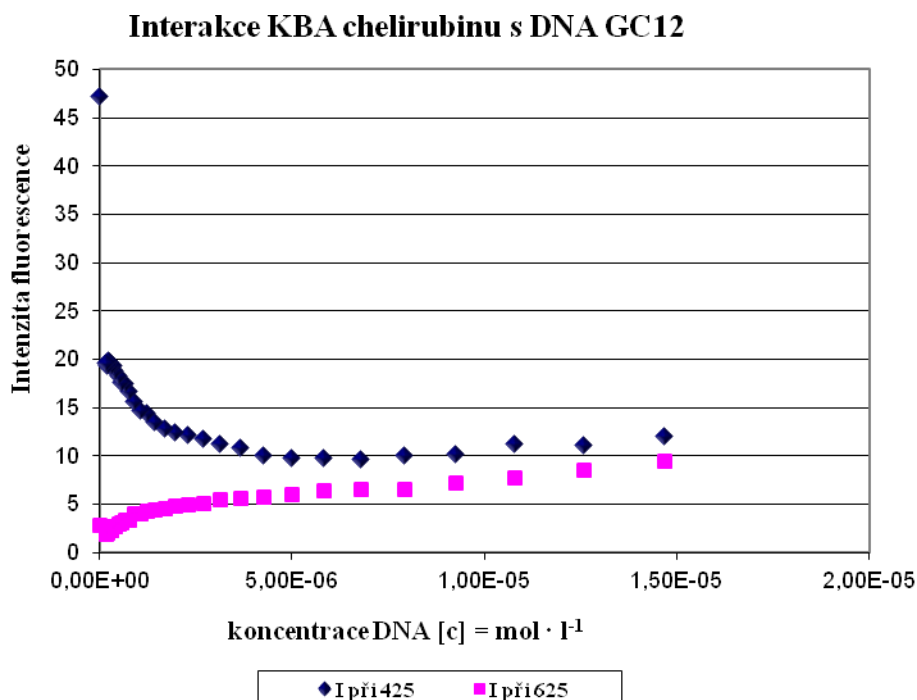
Pomocí fluorescenčního spektrometru byla studována interkalace kvartérního benzo[c]fenanthridinového alkaloidu chelirubinu se čtyřmi strukturami DNA. pH bylo ve všech měřeních korigováno fosfátovým pufrům na hodnotu 6,2, jelikož je kvartérní forma alkaloidu, vyskytující se v kyselém prostředí, reaktivnější než forma pseudobáze.²⁴

Měření probíhala za pokojové teploty v křemenné kyvetě o hraně 1 cm a objemu 700 μl . Přesnost měření vysokou měrou ovlivňuje rozptyl světla, proto bylo při měřeních zachováno konstantní nastavení spektrometru, byly nastaveny vlnové délky, při kterých byla intenzita fluorescence alkaloidu nejsilnější – pro excitaci 350 nm a pro emisi 420 nm. Rozsah byl nastaven na 380 – 680 nm, v tomto rozsahu se objevily dva pásy. První pás odpovídal fluorescenci alkaloidu a jeho maximum se pohybovalo v okolí 425 nm, druhý pás odpovídal fluorescenci komplexu interkalovaného alkaloidu s DNA, jeho maximum se pohybovalo v okolí 625 nm. U všech měření byl fotonásobič nastaven na 1000 V, rychlost snímání na $10 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ a opakovatelnost měření na 5.

Titrační křivky byly sestrojeny z emisních snímků různých DNA při maximálních intenzitách fluorescence obou pásů. Z jejich obrázků je patrné, že při interakci alkaloidu s DNA dochází k rapidní degresi intenzity fluorescence samotného alkaloidu (první pás), zatímco u druhého pásu (komplex alkaloidu a DNA) dochází ke gradaci intenzity fluorescence. U všech měření byla prokázána interkalace CHR s DNA.

Výjimku tvoří AT12, kde se kvůli nízké *melting temperature*, tedy teplotě, kdy dochází k rozpletání dsDNA na ssDNA, nepodařilo změřit specifická interakce alkaloidu. Na snímcích je patrná chronologická degrese signálu způsobená právě denaturací dsDNA na ssDNA, tento jev byl popsán v literatuře.¹

5.1 Interakce CHR s DNA GC12

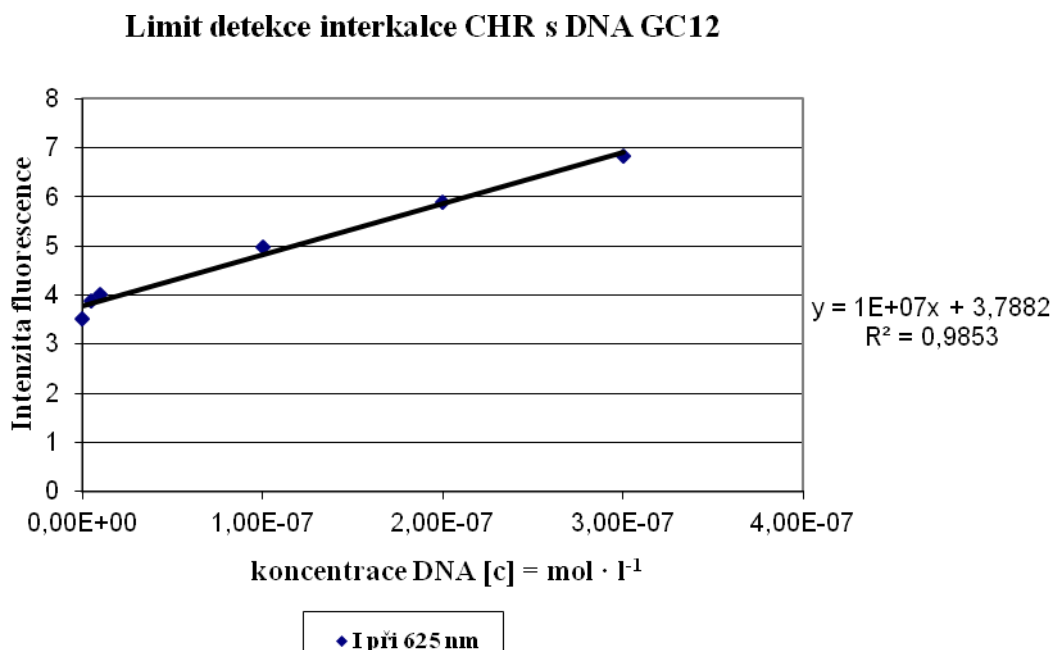


Obrázek 6: Závislost fluorescence chelirubinu na DNA GC12 pro vybrané vlnové délky

Pomocí měření byla zjištěna maximální intenzita fluorescence alkaloidu chelirubinu. U emisního spektra se pohybovala v okolí 425 nm a v případě emisního spektra v okolí 625 nm.

Po přidání DNA GC12 do roztoku alkaloidu došlo k rapidní degresi intenzity fluorescence chelirubinu (pás 425 nm), naopak však vzrostla intenzita fluorescence v druhém pásu (pás 625 nm). Tato závislost je vyjádřena na **Obr. 6**.

5.2 LOD metody interkalace CHR s DNA GC12



Obrázek 7: Limit detekce interkalace chleirubinu s DNA GC12

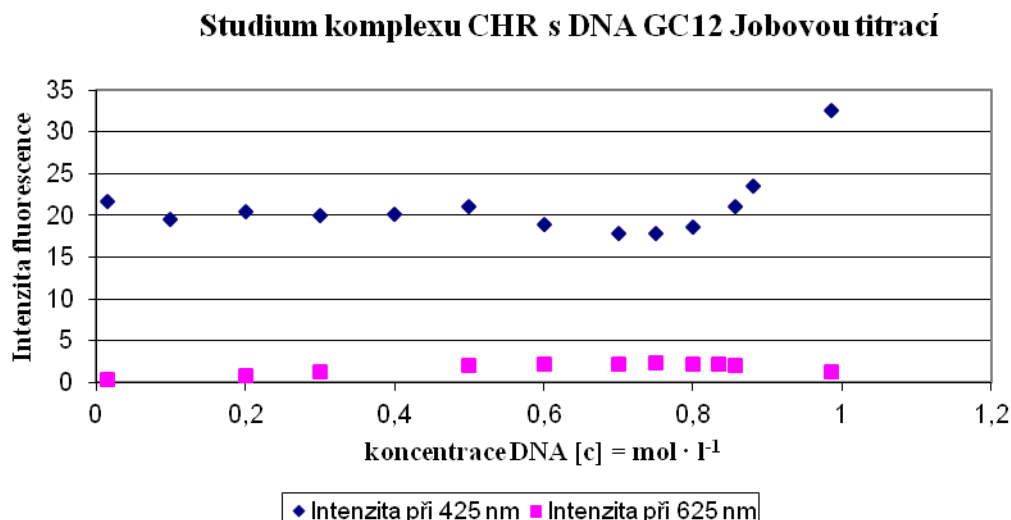
Z **Obr. 7** je patrné, že závislost fluorescence komplexu CHR a DNA GC12 je v nízkých koncentracích DNA GC12 lineární. Vysoká hodnota rovnice lineární regrese poukazuje na spolehlivost použité metody.

Limit detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Pomocí hodnot šumu byla vypočtena hodnota směrodatné odchylky ($S_m = 0,29044$). Dále byl vybrán bod, který leží co nejbližší rovnici regrese ($I_F = 5,88403$; $c_{DNA} = 2,00 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a od jeho intenzity fluorescence byla odečtena hodnota intenzity fluorescence při nulové koncentraci DNA ($I_F = 3,50928$, $c_{DNA} = 0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$).

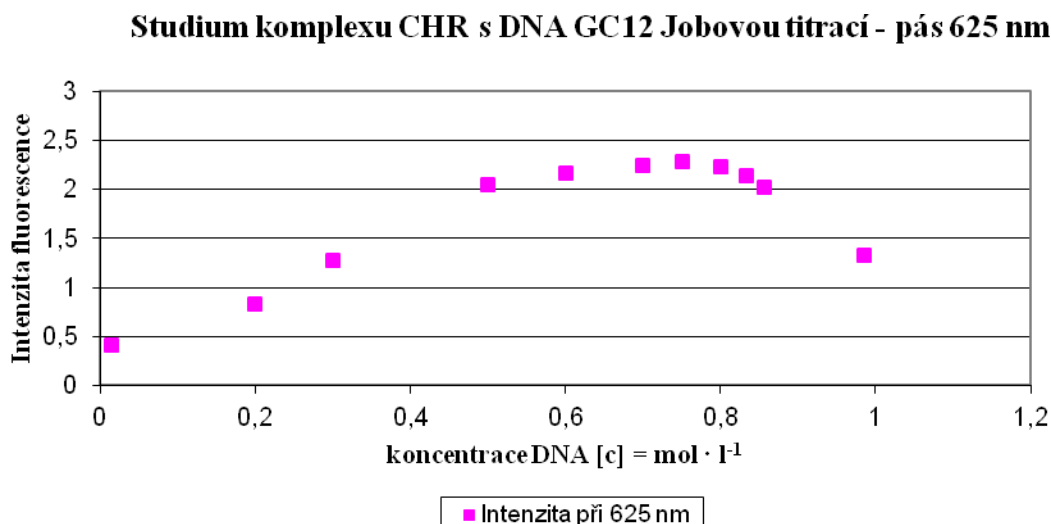
Výsledná intenzita ($I_F = 2,37475$) odpovídá změně intenzity způsobené interakcí CHR s DNA GC12 při koncentraci $2,00 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Limit detekce byl vypočítán jako součin trojnásobné hodnoty směrodatné odchylky a koncentrace DNA odpovídající stanovenému bodu ($2,00 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) dělený změnou intenzity fluorescence při této koncentraci. Limit detekce nabývá hodnoty $7,34 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

$$\text{LOD} = \frac{3 * S_m * c_{DNA}}{\Delta I_F}$$

5.3 Studium komplexu KBA chelirubinu s DNA GC12 Jobovou titrací (JT)



Obrázek 8: Studium komplexu KBA CHR s DNA GC12 Jobovou titrací

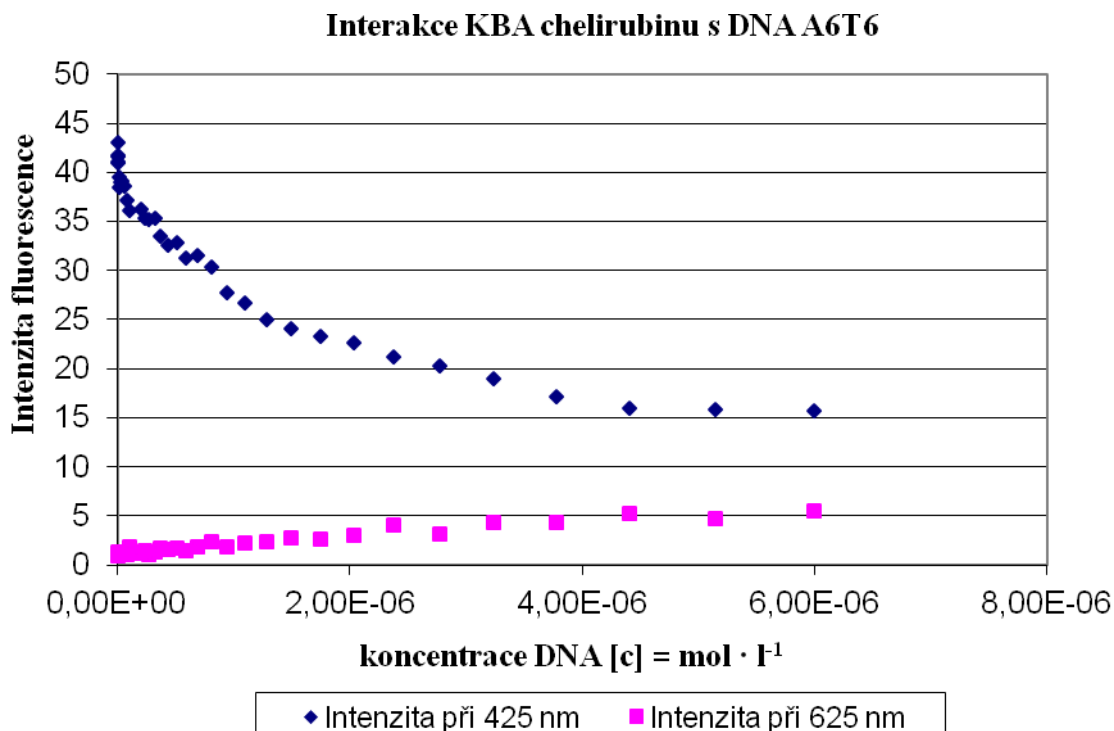


Obrázek 9: Studium komplexu KBA CHR s DNA GC12 Jobovou titrací – pás 625 nm

Jobova titrace slouží ke stechiometrickému určení složení a podmíněné konstanty stability roztoku. Principem metody je míchání ekvimolárních roztoků látek A a B, tak že aby celková koncentrace c_0 byla konstantní ($c_0 = c_A + c_B$), naproti tomu se mění ekvimolární podíl koncentrací v roztoku x_B .

Nejvyššího signálu bylo dosaženo při přibližném poměru koncentrací 0,7149. Z toho vyplývá, že se alkaloid na DNA váže v poměru 3:1, na čtyři báze oligonukleotidu tedy připadá jedna molekula CHR.

5.4 Interakce CHR s DNA A6T6



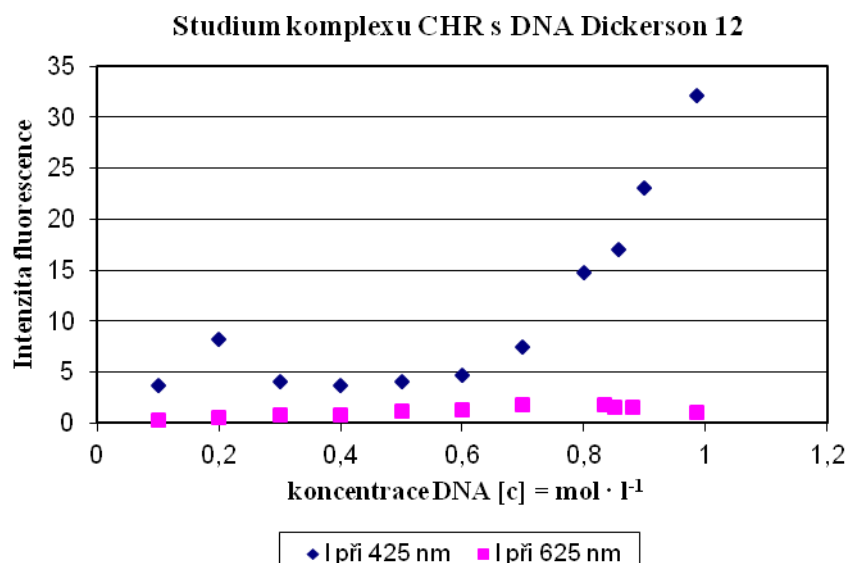
Obrázek 10: Závislost intenzity fluorescence KBA chelirubinu na koncentraci DNA A6T6

Pomocí měření byla zjištěna maximální intenzita fluorescence alkaloidu chelirubinu. U xcitačního spektra se pohybovala v okolí 425 nm a v případě emisního spektra v okolí 625 nm.

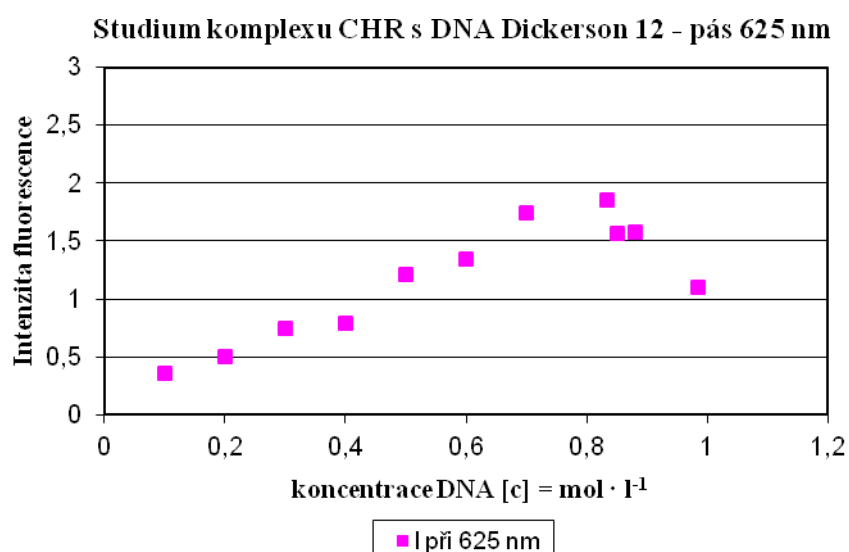
Po přidání DNA A6T6 do roztoku alkaloidu došlo k rapidní degeneraci intenzity fluorescence chelirubinu (pás 425 nm), naopak však vzrostla intenzita fluorescence v druhém pásu (pás 625 nm). Tato závislost je vyjádřena na **Obr. 10**.

Při porovnání grafů na **Obr. 6** a **10** je patrné, že interakce CHR s A6T6 je slabší. Je to zřejmě způsobeno slabšími nekovalentními interakcemi mezi adeninem a thyminem u A6T6 než mezi cytosinem a guaninem u GC12.

5.5 Studium komplexu KBA chelirubinu s DNA Dickerson12 JT



Obrázek 11: Studium komplexu KBA CHR s DNA Dickerson12 Jobovou titrací

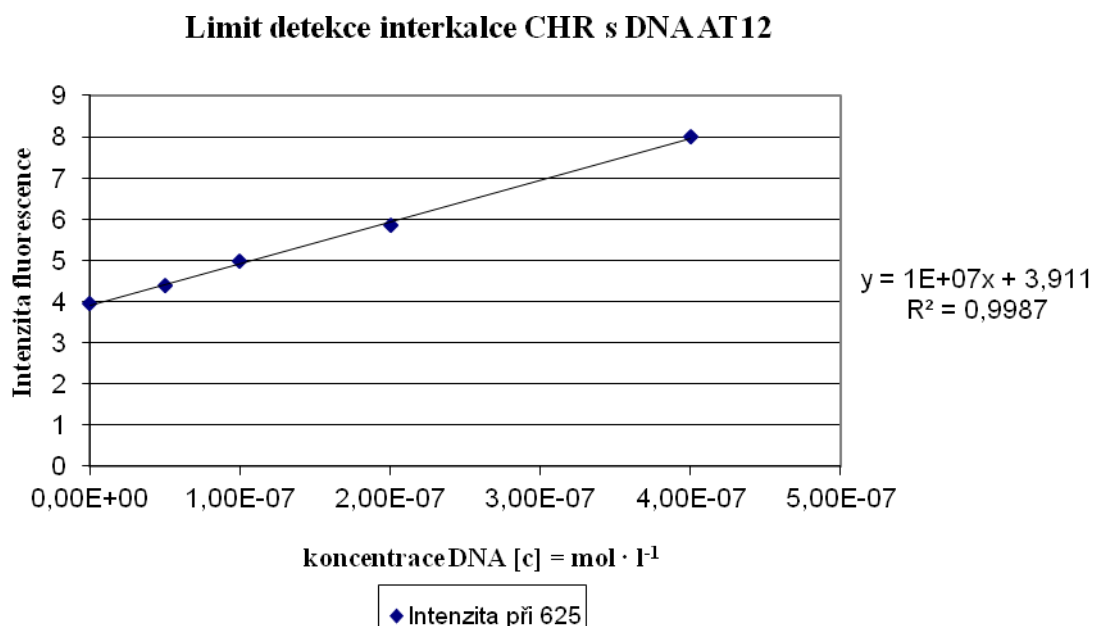


Obrázek 12: Studium komplexu KBA CHR s DNA Dickerson12 Jobovou titrací – pás 625 nm

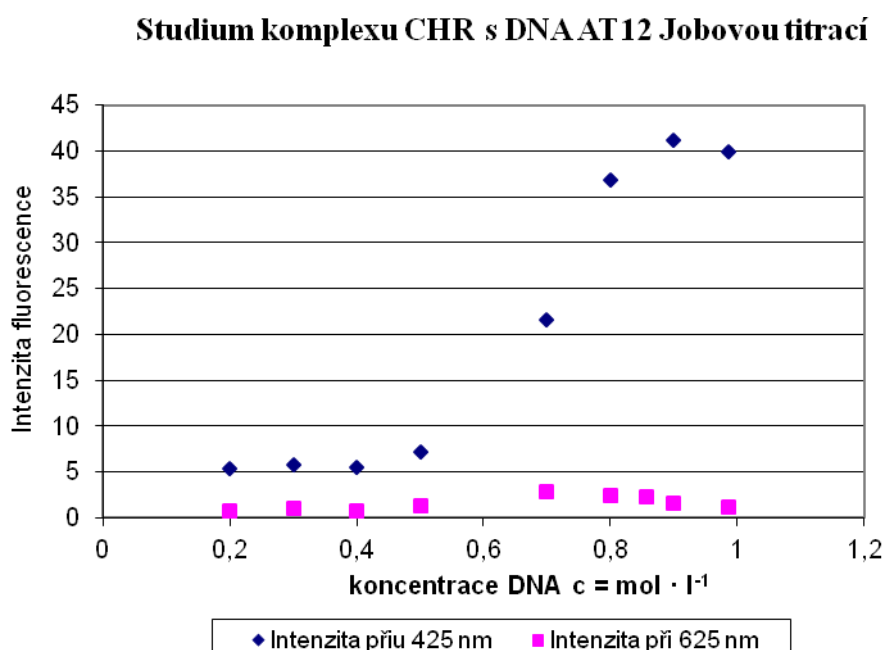
Nejvyššího signálu bylo dosaženo při přibližném poměru koncentrací 0,815. Z toho vyplývá, že se alkaloid na DNA váže v poměru 4:1, na tři báze oligonukleotidu tedy připadá jedna molekula CHR.

Poměr vaznosti CHR a DNA u Dickerson12 je vyšší, než jaký byl prokázán v interakci s GC12. To je zřejmě způsobeno větší různorodostí struktury Dickerson12 a menšími nekovalentními interakcemi mezi bázemi Dickerson12 než u bází GC12, tzn. nižší stabilitou struktury Dickerson12.

5.6 LOD metody interkalace CHR s DNA GC12 a studium tohoto komplexu JT



Obrázek 13: Limit detekce interkalace CHR s DNA AT12

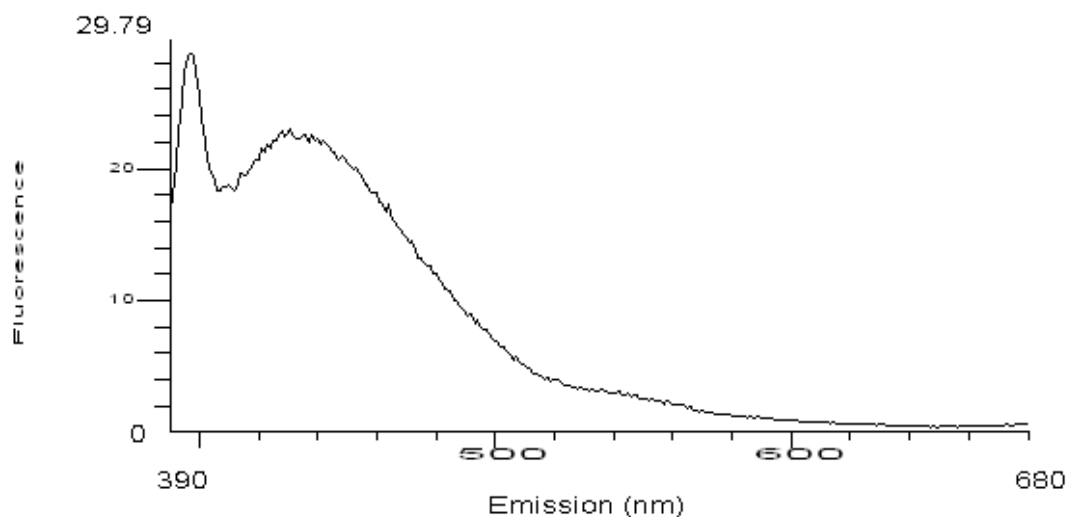


Obrázek 14: Studium komplexu KBA CHR s DNA AT12 Jobovou titrací

Naměřené hodnoty dokazují, že pro interakci CHR s DNA, musí být DNA ve formě dvoušroubovice.

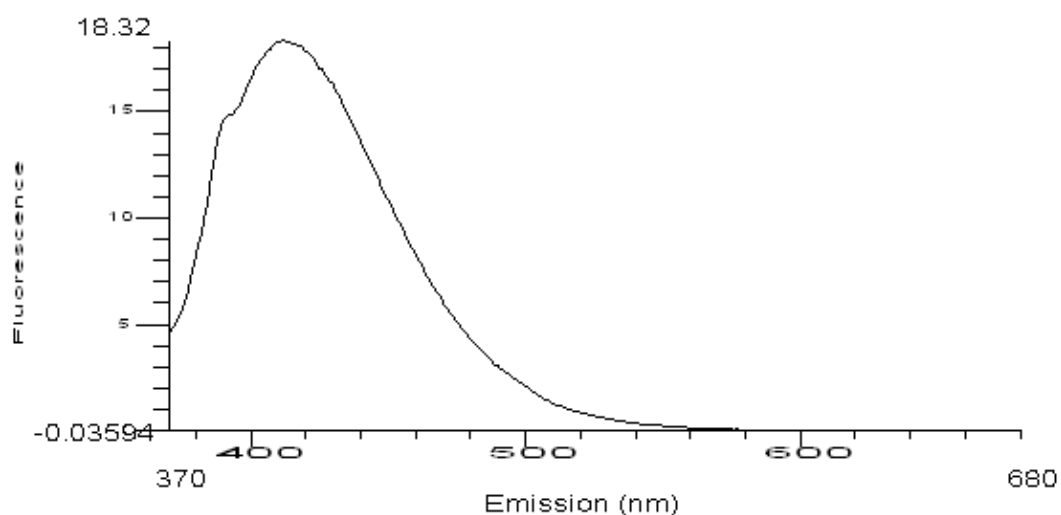
5.7 Studium faktorů ovlivňujících fluorescenci chelirubinu

Jako srovnávací vzorek byl připraven fosfátový roztok chelirubinu. Maximální intenzity fluorescence pro alkaloid bylo dosaženo v oblasti 430 nm, intenzita odpovídala hodnotě 22,6697.



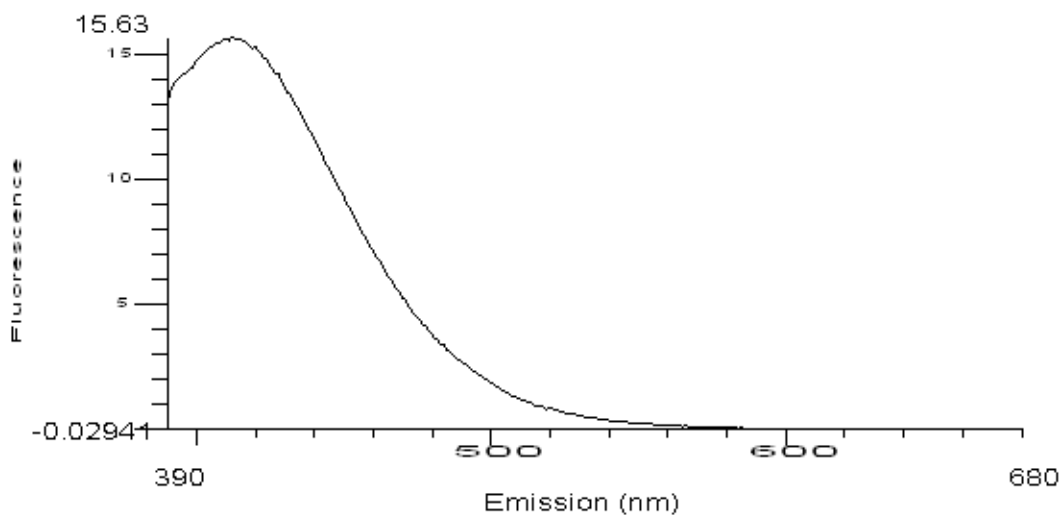
Obrázek 15: Fluorescenční spektrum chelirubin v roztoku fosfátového pufru

Dále byla studována fluorescence v nepolárních rozpouštědlech bez přítomnosti pufru. Byl připraven cyklohexanový roztok chelirubin, jehož maximum intenzity se pohybovalo v oblasti 410 nm a odpovídalo hodnotě 18,3212.



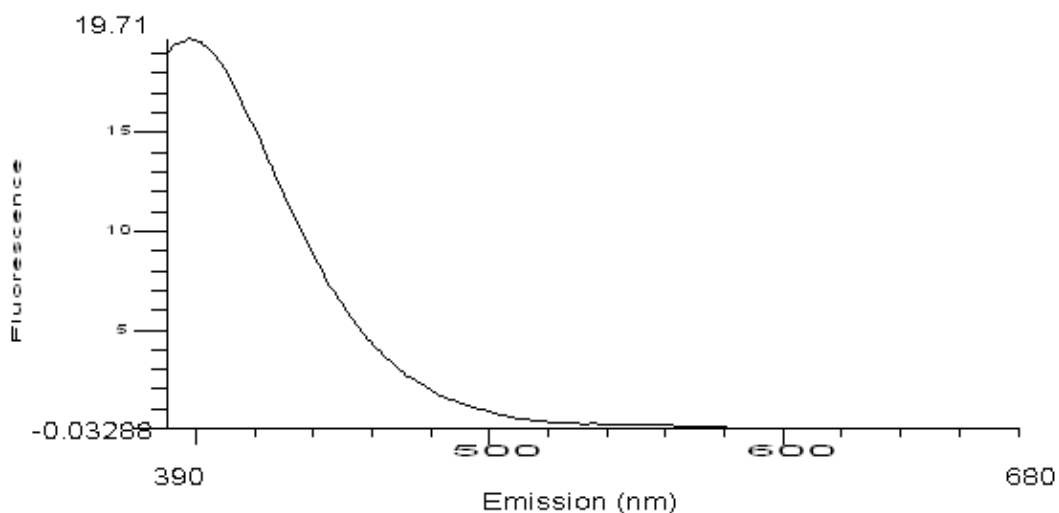
Obrázek 16: Fluorescenční vlastnosti chelirubin v roztoku cyklohexanu

Jelikož jsou nukleotidy aromatické látky, byla změna fluorescence studována i v aromatickém prostředí. Byl připraven benzenový roztok chelirubinu, jehož maximum se pohybovalo opět v oblasti 410 nm a odpovídalo hodnotě 15,6317. Intenzita je nepatrně menší, to ale může být způsobeno špatným převedením organického podílu do benzenové fáze.



Obrázek 17: Fluorescenční vlastnosti chelirubinu v roztoku benzenu

Byla studována interakce i s polárními organickými rozpouštědly. Za modelový příklad byl vybrán ethanolový roztok, jehož maximum intenzity se pohybovalo už u 400 nm a odpovídalo hodnotě 19,1735.

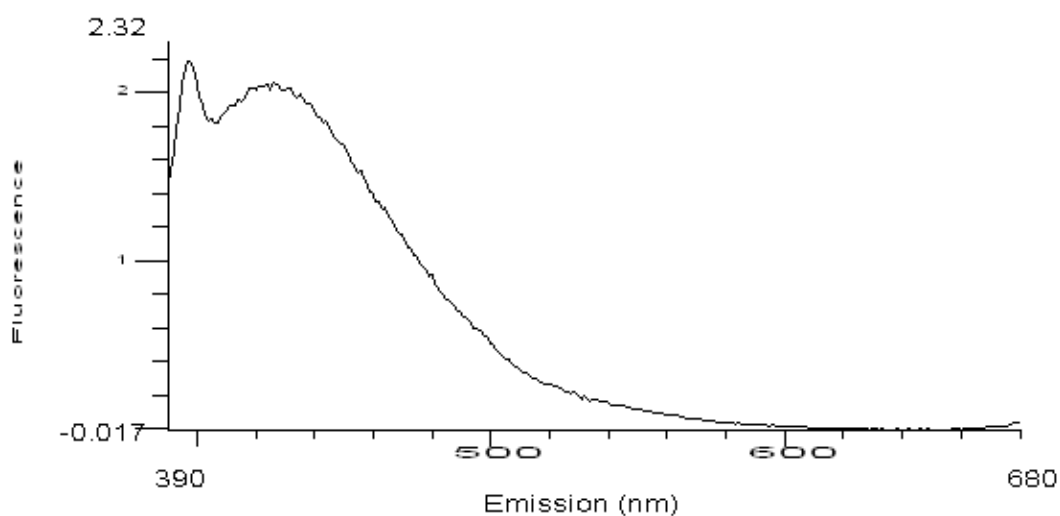


Obrázek 18: Fluorescenční vlastnosti chelirubinu v roztoku ethanolu

Ani v jednom z těchto vzorků se nemohl objevit pík v oblasti 620 nm, odpovídající změně fluorescence v interakci chelirubin s DNA.

Byl navržen experiment, kdy byl připraven vysoce koncentrovaný roztok guaninu ($c = 3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), do něhož byl přidán chelirubin. Teoreticky mělo dojít k částečnému seskupení molekul guaninu do patrovité struktury, do které by se mohl chelirubin interkalovat. K tomuto jevu nedošlo, proto se dá předpokládat, že pro úspěšný průběh interkalace je zapotřebí přítomnost nukleosidů.

Maximum intenzity bylo naměřeno v oblasti okolo 430 nm a odpovídalo hodnotě 2,02103. Hodnota intenzity pro oblast 620 nm byla téměř nulová ($I_F = 0,002219$).



Obrázek 19: Fluorescenční vlastnosti chelirubinu v roztoku guaninu

5.8 Souhrnné výsledky

U všech zkoumaných vzorku bylo zjištěno, že kvartérní benzo[c]fenanthridinový alkaloid chelirubin reaguje s dvoušroubovicí DNA mechanismem interkalace, neváže se tedy na fosfátový aniont a ani nevniká do velkého žlábků. Toho bylo dosaženo přidáním chloridu sodného, který udržoval konstantní iontovou sílu roztoku a napomáhal tak přístupu alkaloidu k centru dvoušroubovice.

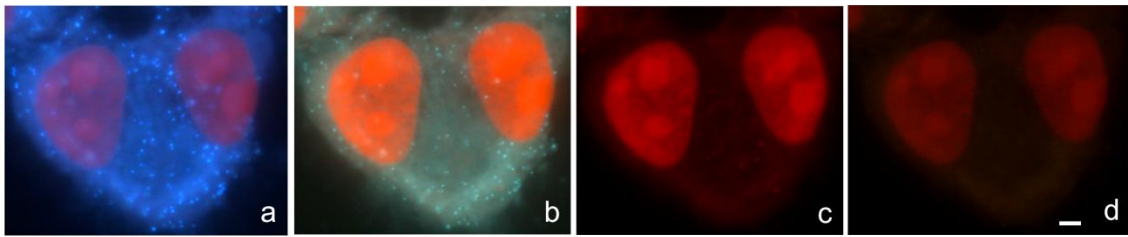
V porovnání fluorescenčního spektra interakce DNA s GC12 a A6T6 je patrné, že při interakci CHR s DNA je pokles intenzity fluorescence alkaloidu a nárůst intenzity fluorescence komplexu CHR-DNA rapidnější. Z toho vyplývá, že stabilita komplexu CHR-GC12 je vyšší než CHR-A6T6. To však nemění specifickou selektivitu chelirubin vůči párům nukleotidů, která je podle těchto výsledků stejná pro všechny páry bází.

Byly změřeny i limity detekce těchto metod, jejich hodnoty se pohybovaly řádově $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, což poukazuje až na stonásobně vyšší citlivost detekce, než je obvyklá u běžných analytických metod. Při převedení na hmotnostní podíl v roztoku limit detekce odpovídá řádově desítkám $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, tedy až dvojnásobné citlivosti než u ethidium bromidu běžně využívaném v analytické praxi.

Byla prostudována i stechiometrie komplexů CHR-DNA, konkrétně i oligonukleotidů Dickerson12 a GC12. Vyšší poměr stechiometrie byl prokázán u oligonukleotidu Dickerson12, to je zřejmě způsobeno jeho zvláštní strukturou, kde sekvence bází AATT deformuje dvoušroubovici a částečně rozplétá B-geofornu, což může zapříčinit snazší přístup alkaloidu k bázím. Stechiometrie těchto komplexů je velice podobná, což opět potvrzuje, že chelirubin není specificky selektivní vůči bázím nukleových kyselin.

Rovněž bylo prokázáno, že chelirubin nereaguje s vlásenkovou formou DNA, ale pro interakci vyžaduje dvoušroubovici, což rovněž potvrdilo, že mechanismem interakce CHR-DNA je interkalace.

Z výsledků je patrné, že by chelirubin, obecně i KBA, mohly najít uplatnění v klinické praxi jako fluorescenční DNA sondy a jako supravitální barviva nukleových schopná pronikat semipermeabilní membránou v důsledku jejich polarizace. Z výsledků je rovněž patrný velice zvláštní efekt probíhající v průběhu interkalace. Zatímco u ostatních KBA dochází k poklesu nebo naopak zvýšení intenzity fluorescence v přítomnosti dsDNA, u chelirubin dochází k posuvu fluorescenčního spektra téměř o 200 nm. Tento jev je obzvláště patrný při interakci s buňkou.



Obrázek 20: Obarvení nádorové buňky HeLa chelirubinem - obrázky za použití různých fotofilmů, modře zářící oblasti buňky bez DNA, červeně s DNA⁴¹

Výsledky získané prací dále mohou sloužit jako vodítko k dalšímu prohlubování znalostí o tomto alkaloidu a využití jeho vlastností v analytické či klinické praxi například pro vysoce citlivou detekci DNA pomocí interakce s CHR nebo výzkumu fluorescenčních vlastností *in vivo* pomocí fluorescenční mikroskopie (viz **Obr. 20**) nebo flow-cytometrie například v rakovinných či apoptických buňkách.

Jelikož se jedná o minoritní KBA, který dosud nebyl příliš prostudován, jsou výsledky předkládané v této práci ojedinělé a přináší tak nový pohled na fluorescenční vlastnosti chelirubinu.

6 PŘÍLOHY

6.1 Použité symboly

A	adenin	LOD	limit detekce
A6T6	5' – AAA AAA TTT TTT – 3'	mDNA	mitochondriální DNA
AT12	5'- ATA TAT ATA TAT – 3'	MA	makarpin
BBE	berberine bridge enzyme	p. a.	chemikálie pro analýzu
C	cytosin	P450	cytochrom P450
Dickerson12	5' – CGC GAA TTC GCG – 3'	pDNA	plastidová DNA
dsDNA	dvoušroubovnicová DNA	PI	propidium jodid
EB	ethidium bromid	PO_4^{3-}	fosforečnanový aniont
G	guanin	rRNA	ribozomální RNA
GC12	5' – GCG CGC GCG CGC – 3'	SA	sanguinarin
HeLa	buněčná linie karcinom děložního čípku nepodléhající Hyflickovu limitu	SL	sanguilutin
CHE	chelerythrin	S_m	směrodatná odchylka
CHL	chelilutin	SR	sanguirubin
CHR	chelirubin	ssDNA	vláseňková DNA
KBA	kvartérní benzo[c]fenan- thridinové alkaloidy	λ_{em}	emisní vlnová délka
		λ_{exc}	excitační vlnová délka
		Å	angstrom

7 REFERENCE

- [1] MOKRIŠOVÁ B.: *Diplomová práce: Štúdium interakcie alkaloidu chelirubínu s DNA*, str.6
- [2] VODRÁŽKA Z.: *Biochemie: Kniha třetí*, Academia, 2. opravené vydání, Praha, 2007, str. 66
- [3] MINAŘÍK J.: *Farmakognosie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1979. 383 s.
- [4] HOBHOUSE H.: *Šest rostlin, které změnil svět*. Academia, Akademie věd České republiky, Praha, s. 23 (2004)
- [5] HAMPL F., RÁDL S., PALEČEK J.: *Farmakochemie*. 2. vydání. Praha : VŠCHT Praha, 2007, str. 187
- [6] HAMPL F., RÁDL S., PALEČEK J.: *Farmakochemie*. 2. vydání. Praha : VŠCHT Praha, 2007, str. 220
- [7] KUŠNYROVÁ I.: *Bakalářská práce: Štúdium spektrálních vlastností alkaloidu chelilutinu*, str. 6
- [8] MOKRIŠOVÁ B.: *Bakalářská práce: Interakce benzofenanthridinových alkaloidů s vlásenkovou DNA*, str.5
- [9] DOSTÁL J., SLAVÍK J.: *Nejnovější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech*, *Chemické listy* 94, 15 – 20 (2000)
- [10] ŠIMÁNEK V, ČERNÁ H, VIČAR J, JEZDINSKÝ J, VÁLKA I, CZ 279327
- [11] CAI M., ZHOU Y., WANG X., LI R., LIAO X., DING L., *Rapid structural characterization of isomeric benzo[c]phenanthridine alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 1931 - 1936, 2007.
- [12] DANA J. F.: NY, *Med Phys J* 6, 218-224(1827)
- [13] SLAVÍK J, SLAVÍKOVÁ L: *Chemické listy* 48, 1382 (1954)
- [14] SLAVÍK J, SLAVÍKOVÁ L: *Collect Czech Chem Commun* 25, 1667 (1960)
- [15] VALEUR, B.: *Molecular fluorescence: Principles and Application*, Wiley - VCH, Německo, 2001.
- [16] RYBÁKOVÁ S.: *Bakalářská práce: Interakce benzofenanthridinových alkaloidů s vlásenkovou DNA*, str. 7-8
- [17] SKOOG D. A., WEST D. M., *Principles of Instrumental Analysis*, Second edition, Saunders College, Holt, 1980

- [18] LAKOWICZ J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third edition, Kluwer Academic Publishers, USA, 1999.
- [19] BERNARD J. A., CHAYEN R., *Modern methods of Chemical Analysis*, McGraw-Hill Publishing Company Limited, London, 1965
- [20] URBANOVÁ J., LUBAL P., SLANINOVÁ I., TÁBORSKÁ E., TÁBORSKÝ P., *Fluorescence properties of selected benzo[c]phenanthridine alkaloids and studies of their interaction with CT DNA*, Anal. Bioanal. Chem. 394, 997 - 1002, 2009.
- [21] AHMAD N, GUPTA S, HUASIN MM, HEISKANEN KM, MUKHTAR H, *Clin Cancer Res*, 6:1524 – 1528 (2000)
- [22] HABERMEHL D., et al.: *Protoapoptotic activity of Ukrain is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial dech pathway*, BMC Cancer (2006) – Datum posledního ověření 6. 5. 2012
(<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2407-6-14.pdf>)
- [23] SLANINOVÁ I., SLANINA J., TÁBORSKÁ E., *Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenantridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond*, Chem. Listy 102, 427 - 433, 2008.
- [24] SUCHOMELOVÁ J.: *Disertační práce: HPLC studium kvartérních benzofenantridinových alkaloidů ve vybraných rostlinných druzích rodučeledi Papavericeae*, s. 14 (2007)
- [25] FARNSWORTH R., *Natural Product and Drug Development*, Munksgaard, Copenhagen , p. 1(1984).
- [26] SPENCER I. D., *Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam, Vol. 20, p. 231 (1965)
- [27] ZENK, M. H.: *The formativ of benzophenanthridine alkaloids*. Pure & Appl. Chem., Vol. 66, Nos. 10/11, pp. 2023 – 2028 (1998)
- [28] DAHM R. *Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research*. Hum. Genet., January 2008, roč. 122, čís. 6, s. 565–81.
- [29] LEVENE P. *The structure of yeast nucleic acid*. J Biol Chem, 1 December 1919, roč. 40, čís. 2, s. 415–24. – Datum posledního ověření 6. 5. 2012
(<http://www.jbc.org/content/40/2/415.full.pdf+html>)
- [30] WATSON J.D., CRICK F.H.C.: *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*. Nature, 1953, roč. 171, čís. 4356, s. 737–738. – Datum posledního ověření 6. 5. 2012
(<http://www.nature.com/nature/dna50/watsoncrick.pdf>)

- [31] VODRÁŽKA Z.: *Biochemie: Kniha první*, Academia, 2. opravené vydání, Praha, str. 95 (2007)
- [32] MURRAY, R. K., et al. *Harperova biochemie*. Z angl. 23. vyd. přel. Lenka Fialová et. al. 4. vyd. v ČR. Praha: H & H, 2002. ix, s. 395-399
- [33] CAMPBELL N.A., REECE J.B.: *Biologie*, Computer Press, Brno, 2006
- [34] VOET D., VOETOVÁ J.G.: *Biochemie*. 1.. vyd. Praha : Victoria Publishing, 1995
- [35] POTAMAN V. N., SINDEN R. R.: *DNA: Alternative Conformations and Biology*. [s.l.] : Landes Bioscience, Madame Curie Bioscience Database, 2000.
- [36] URBANOVÁ J.: *Interakce benzofenanthridinových kvarterních alkaloidů s DNA*, s. 25 (2009)
- [37] STIBOR,I.: *Interkalace planárních molekul s nukleovými kyselinami – interkalace*, 2005
- [38] WOO S. H., SUN N.-J., CASSADY J. M., SNAPKA R. M.: *Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids*, *Biochemical pharmacology*, Volume 57, Issue 10, 15 May 1999, Pages 1141–1145 – Datum posledního ověření 6. 5. 2012
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295299000180>
- [39] <http://www.chromspec.cz/produkty/detail.php?name=amincobowman>
– Datum posledního ověření 6. 5. 2012
- [40] <http://www.sci-support.com/items/Orion-720A-pH-ISE-mV-ORP-Meter-1030.htm>
– Datum posledního ověření 6. 5. 2012
- [41] Přednáška Dr. Táborského: *Benzo(c)phenanthridine alkaloids - perspective fluorescent DNA probes*, duben 2012, Barcelona