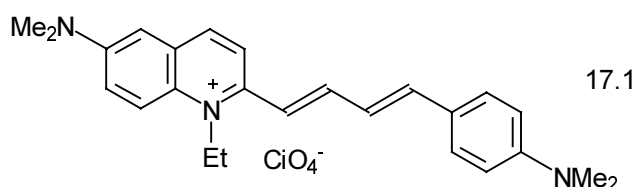


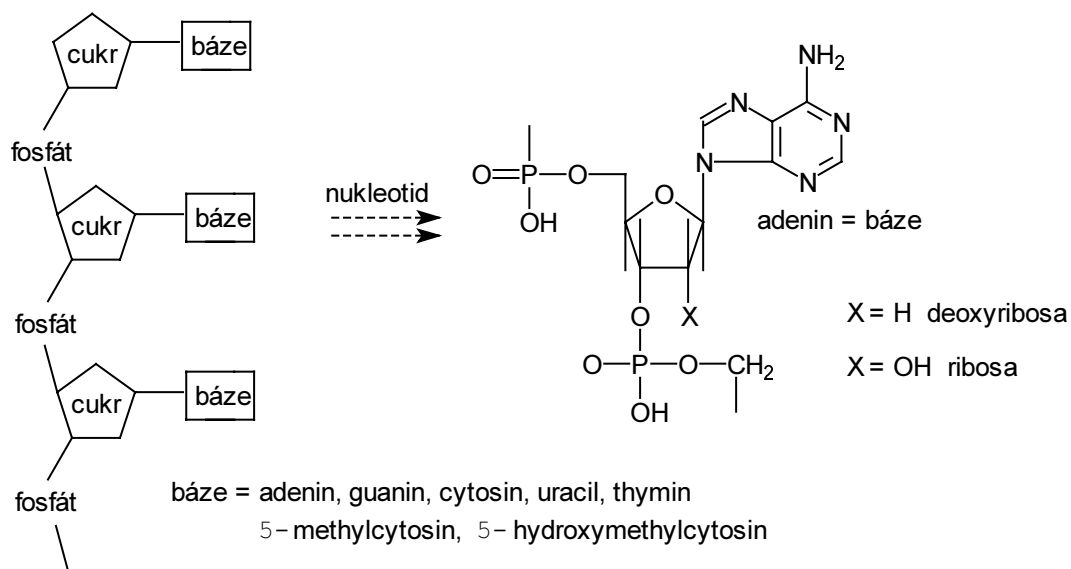
## 17 Organická barviva v molekulární biologii

Lidský genom (kompletní genetická informace) obsahuje tři miliardy nukleotidů, které utváří dvacet dva párů chromozomů a dva autozomy, kde každá tato sekvence DNA obsahuje 50-500 milionů nukleotidů. Organizace a sekvence DNA je v současnosti jedním z nejrychleji se rozvíjejících vědeckých oborů. V současnosti existují dvě techniky, jak stanovit sled jednotlivých nukleotidů v DNA. První je založena na dideoxy terminační metodě řetězce a druhá je založena na chemickém rozkladu makromolekuly. Tak jako tak, obě metody vedou ke vzniku fragmentů DNA, které jsou ukončeny určitými bázemi, a které jsou „označkovány“ různými fluorescenčními barvivy. Princip je ten, že se na DNA nebo její část působí fluorescenčním barvivem (či barvivy - tzv. multicolor technika), které se naváže na určité místo v makromolekule a po rozložení makromolekuly na jednotlivé části lze detekcí luminiscence zjistit místo a tím uspořádat nukleotidů v makromolekule. Jedním z největších problémů této techniky je mít soubor fluorescenčních barviv pro značkování jednotlivých bází, protože se vyžaduje, aby emisní pásy těchto fluoroforů se významně nepřekrývaly. Tento na první pohled snadný požadavek není tak jednoduché vyřešit, protože pološířka emisního pásu obvyklého fluoroforu je 40-80 nm. Znamená to, že požadujeme úzké emisní pásy. Za druhé je nutný poměrně vysoký kvantový výtěžek fluorescence. Tento požadavek platí pro fluorofor, který je navázán na nukleovou kyselinu.

Pokud chceme použít multicolor techniku, to je, že současně jsme použili více fluoroforů, tak vzhledem k tomu, že excitační záření má určitou (jednu) vlnovou délku, je nutné, aby použitá barviva absorbovala v jedné části spektra a s dobrým kvantovým výtěžkem fluoreskovala při rozdílných vlnových délkách (bez překryvu). Je velmi obtížné najít fluorofory s velmi velkým Stokesovým posunem. Příkladem takového fluoroforu je následující cyaninové barvivo (17.1), které má maximum absorpce 543 nm ( $\epsilon = 46000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) a maximum emise 712 nm.

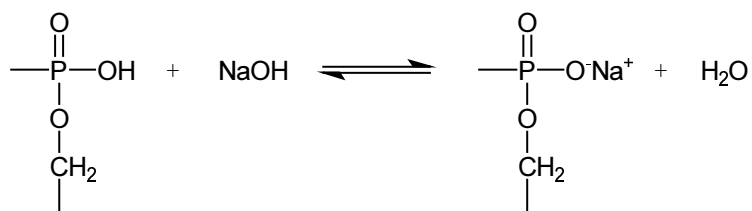


Podíváme-li se na nukleové kyseliny blíže, tak se jedná o makromolekuly tvořené řetězcem spojených nukleotidů. Podle typu cukerné složky rozlišujeme kyselinu deoxyribonukleovou a kyselinu ribonukleovou (obrázek 17-1).



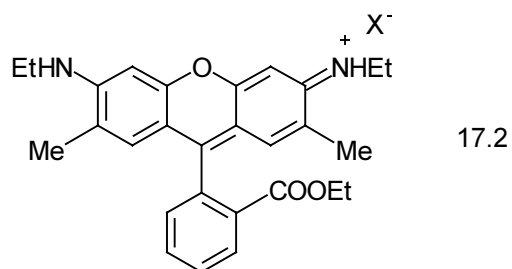
**Obrázek 17-1.** Sekvence DNA, nebo RNA

Pro nás je podstatné, že v alkalickém prostředí, např. působením louhu se ustaví následující rovnováha (obrázek 17-2).

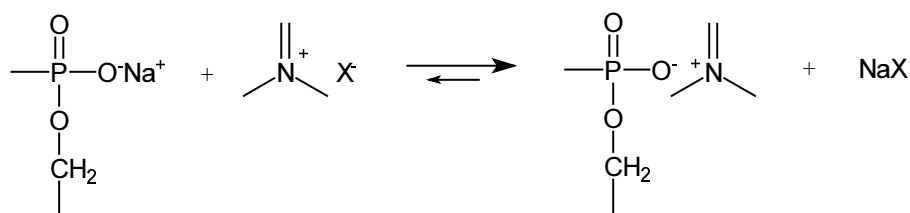


**Obrázek 17-2.** Acidobázická rovnováha fosforečného zbytku

Přidáme-li fluorofor, čili barvivo, které je kationaktivní (v barvářské nomenklatuře označované jako bázičné), například rhodamin 6G (17.2), dojde k iontové výměně.

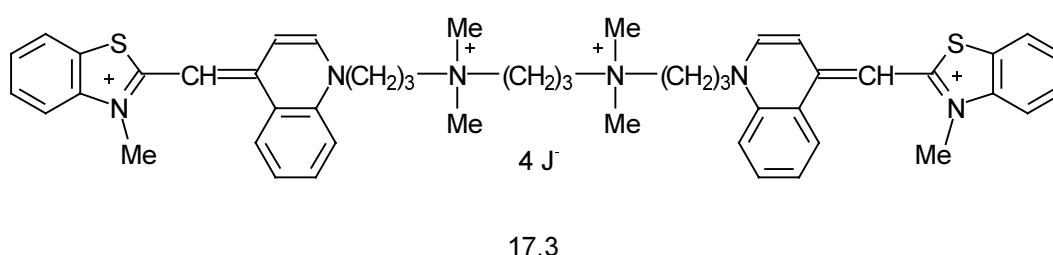


Malý kanion  $\text{Na}^+$  je nahrazen velkým planárním kationem fluoroforu, který díky své planaritě, velkému  $\pi$ -systému a díky vzniku H-vazeb, má velkou afinitu k nukleové kyselině (obrázek 17-3).



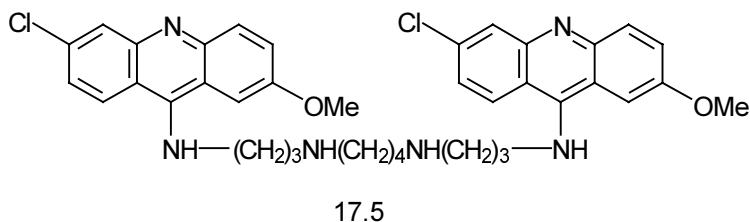
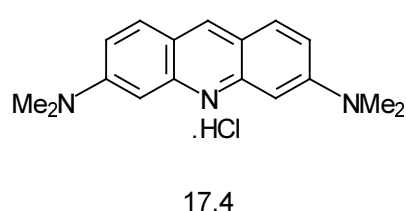
**Obrázek 17-3.** Iontová výměna Na<sup>+</sup> kationtu za kationt barviva

Velikost molekuly fluoroforu a počet kladných nábojů, které si nese je velmi podstatný z hlediska stability molekuly „nukleová kyselina-fluorofor“ což lze dokumentovat tím, že např. molekula „nukleová kyselina-TOTO-1“ je tak stabilní, že se nerozpadne ani při elektroforéze. TOTO-1® je registrovaná značka pro cyaninový bázičný fluorofor, který má 4 kladné náboje (17.3).

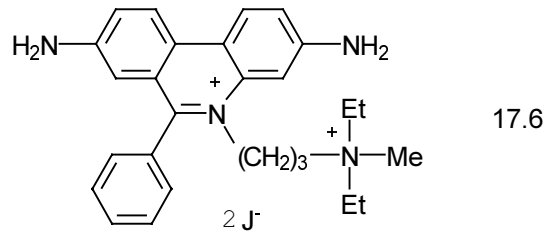


Pro porovnání, molekula „nukleová kyselina-thiazolová oranž“ se při elektroforéze rozpadne a nelze proto tuto čistící techniku v tomto uspořádání použít.

Velikost molekuly fluoroforu a také přítomnost či nepřítomnost náboje je také důležitá z hlediska možnosti penetrace barviva skrz buněčnou membránu a je vlastností, která se také udává u příslušného fluoroforu (angl. permeant, impermeant). To lze dokladovat tím, že například akridinová oranž (17.4) buněčnou membránou prochází, zatímco podobný homodimer (17.5) nikoliv.



Z aplikačního hlediska je výhodné, když fluorofor fluoreskuje až po navázání na nukleovou kyselinu. Toho se docílí tzv. efektem těžkého atomu, kdy barvivo před aplikací má takovou konstituci, že aniont, který kompenzuje kladný náboj vlastního chromoforu má těžký atom, např. Br<sup>-</sup> a nejlépe J<sup>-</sup>. Tento zhasí fluorescenci tak účinně, že kvantový výtěžek fluorescence je < 0,01. Po aplikaci, kdy dojde k iontové výměně se jodidové (nebo bromidové) anionty vymyjou ze vzorku a nová molekula „nukleová kyselina-fluorofor“ intenzivně fluoreskuje (kvantový výtěžek se často blíží 0,9). Například následující fluorofor (17.6) ve vodě velmi slabě fluoreskuje (636 nm), ale po navázání na nukleovou kyselinu stoupne jeho fluorescence o 10 řádů (617 nm).

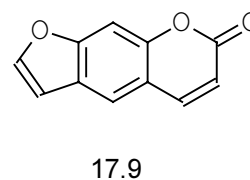
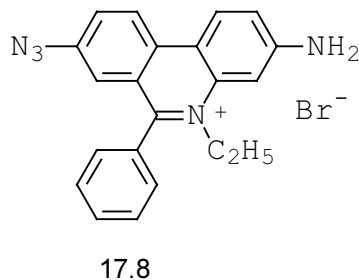
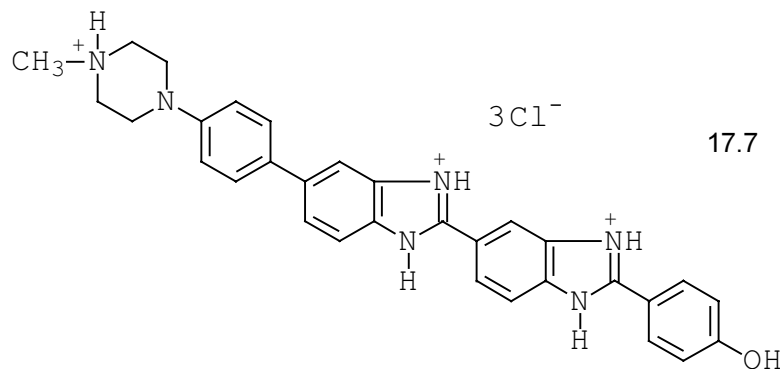


Řada fluorescenčních barviv se používá pro konformační analýzu „in vivo“ a „in vitro“. Intenzita fluorescence, její maximum a vazebná afinita takového barviva silně závisí na sekvenci a konformaci párů bází v DNA.

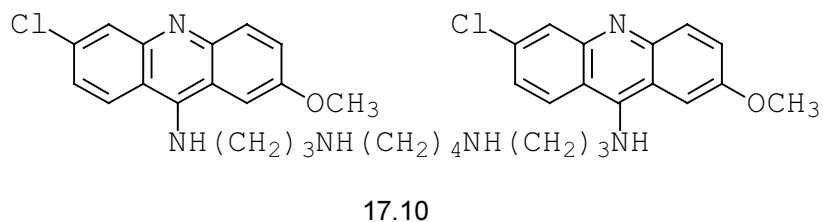
Např. barvivo (17.7) rozliší paralelní a antiparalelní uspořádání částí řetězců v DNA.

Ethidium monoazid (17.8) navázaný na DNA dovoluje měřením zhášení fluorescence zjišťovat pomalé reorientační pohyby.

Psoraleny, např. (17.9), se používají pro odhalení křížových a tzv. Z-oblastí v DNA.

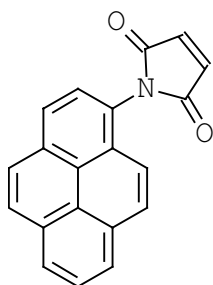


Akridinový homodimer (17.10) má velmi vysokou afinitu k oblastem biomolekuly, které jsou bohaté na adenosin trifosfát (AT).



Je-li navázaný na DNA má modrozelenou fluorescenci, jejíž intenzita stoupne oproti barvivu nenavázanému asi  $10^4$  krát. Tento fluorofor zároveň vyniká vysokou fotostabilitou.

Pro detekci interakce dvou proteinových řetězců se využívá pyrenmaleinimid (17.11).



17.11

Na oba řetězce se tento reaktivní luminofor naváže a platí, že jsou-li oba řetězce (čili pyreny) vzdáleny více než 1 nm, potom luminiskují jako samotný acylovaný amino-pyren, to je 371,5 nm. Ve chvíli, kdy se přiblíží k sobě více, vznikne excimer (dimer v excitovaném stavu) a maximum luminiscence se bathochromně posune na 470 nm.

Další technikou používanou v konformační analýze je fluorescenční rezonanční přenos energie. Spočívá v tom, že jsou-li na dvou místech biomolekuly navázány fluorescenční donor a fluorescenční nebo nefluorescenční akceptor energie, tak při jejich přiblížení dojde v excitovaném stavu k přenosu energie z donoru na akceptor, přičemž akceptor buď fluoreskuje a měří se intenzita jeho luminiscence a nebo akceptor neluminiskuje a měří se úbytek luminiscence donoru (zhasnutí fluorescence donoru). Například:

Donor	Akceptor	$R_0$ ( $10^{-10}$ m)
fluorescein	tetramethylrhodamin	55

Vzdálenost, při které je přenos energie 50% je definována tzv. Förstrovým poloměrem  $R_0$ , který závisí na spektrálních vlastnostech donoru (D) a akceptoru (A). Účinnost přenosu je tím vyšší, čím více se překrývají emisní (fluorescenční) spektrum donoru a absorpční spektrum akceptoru, kde plocha překryvu je dána  $J(\lambda)$ . Zároveň závisí na vzájemné prostorové orientaci D a A. Platí, že:

$$R_0 = [8,8 \cdot 10^{23} \cdot k^2 \cdot n^{-4} QY_D \cdot J(\lambda)]^{1/6} / 10^{-10} \text{ m} ,$$

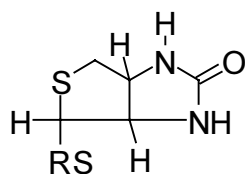
kde  $n$  je index lomu,  $k^2$  je dipolový orientační faktor (jeho hodnota je v rozmezí 0-4,  $k^2=2/3$  platí pro náhodně orientované donory a akceptory),  $QY_D$  je kvantový výtěžek fluorescence donoru v nepřítomnosti akceptoru.

Překryvový integrál je:

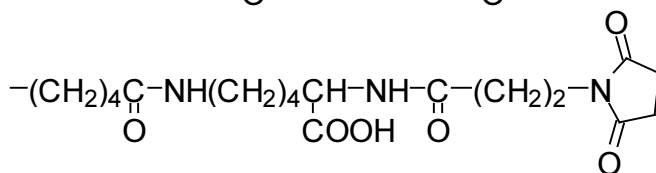
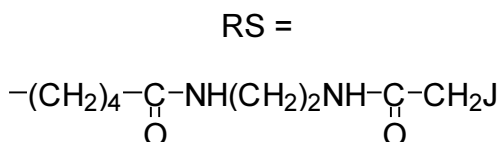
$$J(\lambda) = \int \varepsilon_A(\lambda) \cdot F_D(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad / \text{cm}^3 \text{M}^{-1}$$

kde  $\varepsilon_A$  je absorpční molární koeficient akceptoru,  $F_D$  je intenzita fluorescence donoru vyjádřená jako podíl celkové (integrované) intenzity fluorescence donoru.

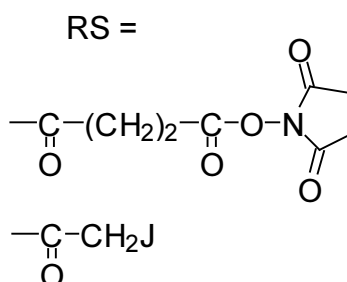
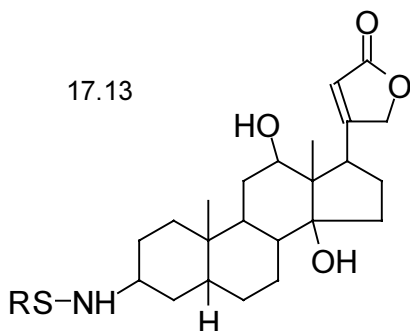
Často se stane, že určité biomolekuly (či určitá místa v nich) jsou slabě detekovatelné. V takovém případě lze využít tzv. avidin-biotin nebo antibody-haptenovou techniku. Ta spočívá v tom, že se na molekulu (nebo určité cílové místo, např. receptor) napojí biotin, nebo hapten. K tomu slouží reaktivní biotinylační činidla, např. biotin jodacetamid, biotin maleinimid (17.12) (oba thiol-reaktivní).



17.12



K haptenylationi se používá například (17.13).

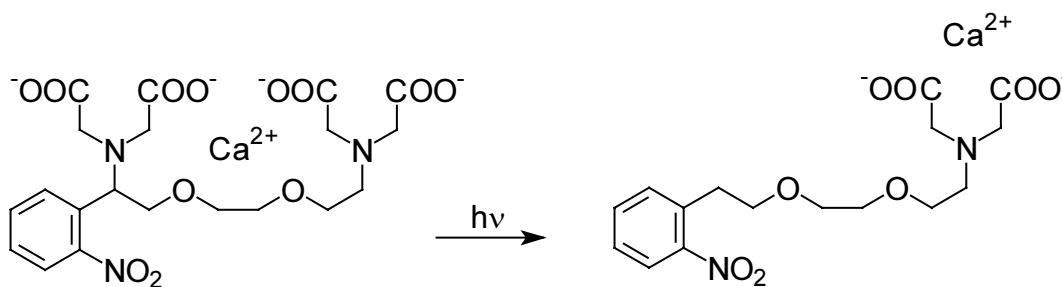


Tímto způsobem dostaneme do daného místa velmi specifické uspořádání (biotin, nebo haptenu), které jsme schopni detekovat vhodným avidinovým konjugátem (avidin se fixuje na biotin) nebo anti-haptenuvým „antibody“ konjugátem (fixuje se na haptenu). Tyto detekční konjugáty jsou označovány fluoroforem, nebo fluorescenčními mikrokuličkami (latexové), enzymy, nebo pouhými barvivy. Tato poměrně komplikovaná detekce se používá z několika důvodů. Za prvé nízkomolekulární reaktivní činidla (které bychom mohli navázat na původní biomolekulu přímo) mají svoje omezení a to v nespecifičnosti působení, za druhé by mohlo dojít k vysrážení biomolekuly, či změně funkce značkováného receptoru. Asi hlavní důvod ale spočívá v tom, že na jednu biotinovou jednotku můžeme fixovat detekční avidinový konjugát, který může mít ve své molekule více fluorescenčních molekul a znásobovat tak detekční signál.

Schopnost avidinu fixovat se na biotin je známá poměrně dlouho (rok 1970). Jedná se o protein izolovaný z vajíček, jehož totální sekvence byla již stanovena (viz Merck Index).

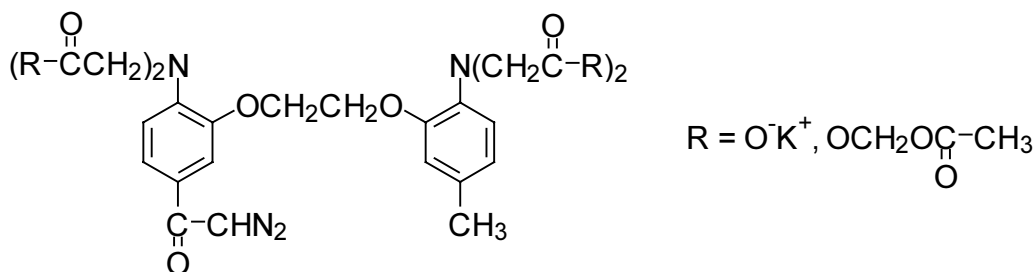
Velmi zajímavou skupinou tzv. „caged probes“ (caged přeloženo uzavřen v kleci) jsou **fotoaktivovatelné sloučeniny**, které zábleskovou fotolýzou uvolňují kontrolovaně v čase a místě biochemicky aktivní produkt (sloučeninu), která před ozářením není aktivní. Pro tyto účely existují „uzavřená fluorescenční barviva“, která fluoreskují až po ozáření (fotoaktivace fluorescence). Nebo se uvolní specifické sloučeniny, které pak mohou např. detekovat množství  $\text{Ca}^{2+}$  (je zajímavé, že rakovinové buňky vykazují zvýšený obsah těchto kationtů), pH, membránový potenciál, neuronové přenosy, apod..

Řada těchto fotoaktivovatelných sloučenin je založena na  $\alpha$ -karboxy-2-nitrobenzyllovém zbytku. Tato skupina zajistí dobrou rozpustnost ve vodě, velkou rychlost fotopřeměny ( $\mu\text{s}$ ) s vysokým kvantovým výtěžkem (0,2-0,4) a biologicky neaktivní vedlejší fotoproduct. Fotoaktivační vlnové délky této skupiny jsou v UV oblasti (max. 360 nm) s maximem absorpce 260 nm. Např. fotoproduct fotochemického štěpení (obrázek 17-4) má o 12,5 řádů menší chelatační účinek  $\text{Ca}^{2+}$  iontů než výchozí nitrofenylderivat tetraoctové kyseliny.



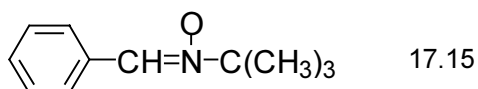
**Obrázek 17-4.** Fotolýza sloučeniny s chelatačním účinkem

Naopak diazo-2 vykazuje velmi nízkou afinitu k  $\text{Ca}^{2+}$  iontům, ale po ozáření UV světlem se jeho afinita zvýčí v řádu 30-ti násobně. Do buněk je možno jej mikroinjektovat jako  $\text{K}^+$  sůl a nebo ve formě esteru (17.14). Fotolyzované diazo-2 váže volné  $\text{Ca}^{2+}$  ionty v průběhu milisekund.



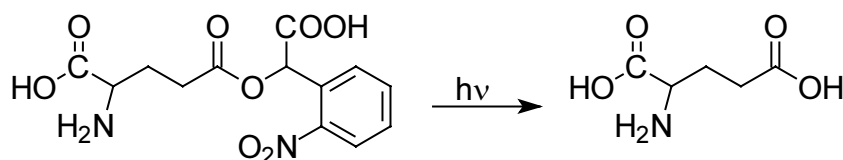
17.14

Oxid dusnatý (NO) hraje důležitou roli v regulaci jistých biochemických procesů, jako např. regulátor tlaku krve, přenos signálu mezi neurony, apod.. Jelikož poločas života NO je asi 5 sekund, lze provádět jen omezený počet pokusů. Jednou z možností je uvolňovat NO fotolýzou sloučenin typu (17.15), které fotolýzou UV zářením uvolňují NO.



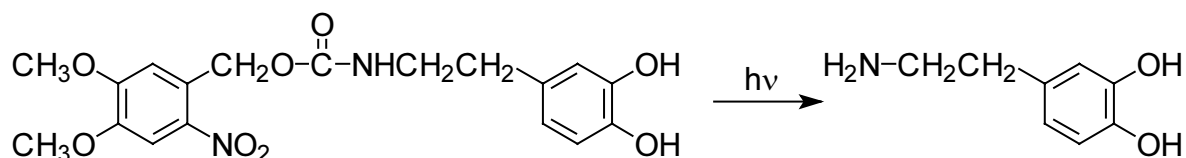
17.15

Další možností jsou fotolabilní enzymatické inhibitory, aktivátory přenosů mezi neurony (obrázek 17-5).



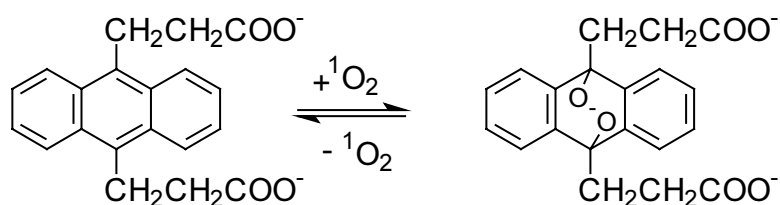
**Obrázek 17-5.** Uvolnění l-glutamové kyseliny fotolýzou inaktivní sloučeniny

Dokonce existují světlem aktivovatelné léky, např. kardiotonikum dopamin (obrázek 17-6).



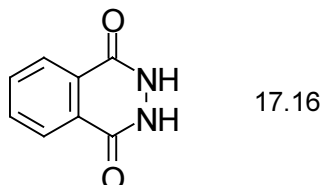
**Obrázek 17-6.** Uvolnění dopaminu fotolýzou inaktivní sloučeniny

Důležitou (a často negativní) roli hraje v organismu singletový kyslík. Doba života singletového kyslíku ( $4,4 \mu\text{s}$ ) je dostatečně dlouhá na to, aby pronikl do buněk a působil v nich. Pokud chceme singletový kyslík generovat, použijeme halogenované deriváty fluoresceinu. Pro detekci singletového kyslíku lze použít např. anthracen-9,10-dipropionovou kyselinu (silně fluoreskuje), která oxidací přechází na nefluoreskující endoperoxid (obrázek 17-7).

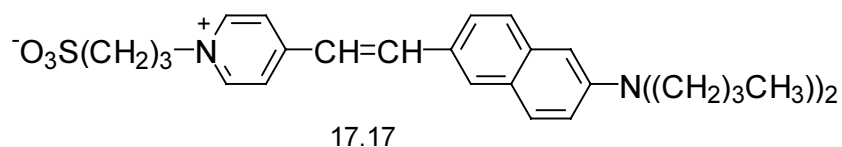


**Obrázek 17-7.** Detekce singletového kyslíku

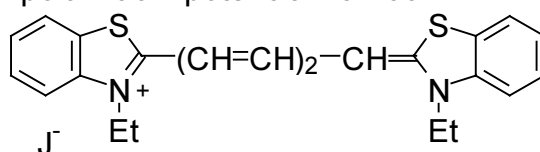
Jinou možností je **generace chemiluminiscence**, např. fosfolipidické hydroperoxydy lze detekovat chemiluminiscencí luminolu (17.16), i když sám o sobě není vhodný pro použití v živých buňkách.



Podobně lze v biochemických aplikacích nalézt fluorescenční indikátory  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , pH indikátory. Jako poslední v této kapitole probereme indikátory membránového potenciálu. Jedná se o sloučeniny, jejichž fluorescence je citlivá na změnu napětí, např. styrylové barvivo (17.17). Toto barvivo nefluoreskuje ve vodném roztoku, ale naváže-li se na fosfolipidickou membránu pak absorbuje při 475 nm a emituje světlo vlnové délky 617 nm.



Velmi se také používají cyaninová barviva, např. (17.18), které ztrácí až 98% fluorescence, stoupne-li polarizační potenciál na 100 mV.



17.18