

Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Bakalářská práce

**Test interakce 8-methoxypsoralenu s plazmovými bílkovinami
albuminem a IgM a jadernou bílkovinou histonem H2A pomocí
fluorescenční spektroskopie**



Kateřina Mašková

Školitel: Doc. RNDr. Šárka Klementová, Csc.

Leden 2010

Bakalářská práce

Mašková K. 2010: Test interakce 8-methoxypsoralenu s plazmovými bílkovinami albuminem a IgM a jadernou bílkovinou histonem H2A pomocí fluorescenční spektroskopie. (Test of interactions of 8-methoxypsoralen with serum proteins, albumin and immunoglobuline IgM, and with histone H2A by the method of fluorescence spectroscopy). Faculty Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: The bachelor thesis deals with interactions of 8-methoxypsoralen (a compound used in PUVA therapy) with three different types of proteins, human serum albumin, immunoglobuline IgM and histone H2A. The technique of fluorescence spectroscopy was adopted for studying the interactions. In the introductory part, fundamentals of fluorescence spectroscopy are presented and characteristics of individual compounds used in the study are given.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Dne 18. 12. 2009

.....
Kateřina Mašková

Poděkování: Moje největší poděkování patří zejména mojí školitelce Doc. RNDr. Šárce Klementové, Csc., která se mnou měla nesmírnou trpělivost, bez jejích rad a pomoci by tato práce nevznikla. Další mé díky patří Mgr. Jánů Štěrbovi za jeho cenné rady do začátku práce. Děkuji všem kamarádům, kteří mě vždycky podrželi a dodali chuť do další práce, zejména Maličké, Vojtovi, Verunce, Kryštofovi, Honzovi a Jirkovi. Děkuji mému Wendovi za neocenitelnou podporu v nejtěžších chvílích a mojí celé rodině za umožnění studia. Děkuji.

Cíle práce

Cílem předkládané práce bylo:

- seznámit se s principem terapeutické metody vyžívající psoralenové deriváty (PUVA terapie);
- zvládnout základy teorie fluorescenční spektroskopie;
- proměřit (s využitím metody fluorescenční spektroskopie), zda dochází k interakci mezi 8-methoxypsoralenem a zástupci bílkovin tří různých skupin, lidského albuminu, imunoglobulinu a histonu.

Obsah:

1. Úvod

1.1. Fluorescenční spektroskopie.....	1
1.2. Albumin, histony, imunoglobuliny.....	2
1.2.1. Albumin.....	2
1.2.2. Histony.....	3
1.2.3. Imunoglobuliny.....	4
1.3. Psoralen a PUVA terapie.....	5
1.3.1. Psoralen.....	5
1.3.2. PUVA terapie.....	7
1.4. Interakce malých molekul s bílkovinami.....	8

2. Experimentální část

2.1. Materiály a metody.....	9
2.2. Výsledky.....	12
2.3. Diskuse.....	17
2.4. Závěr.....	19

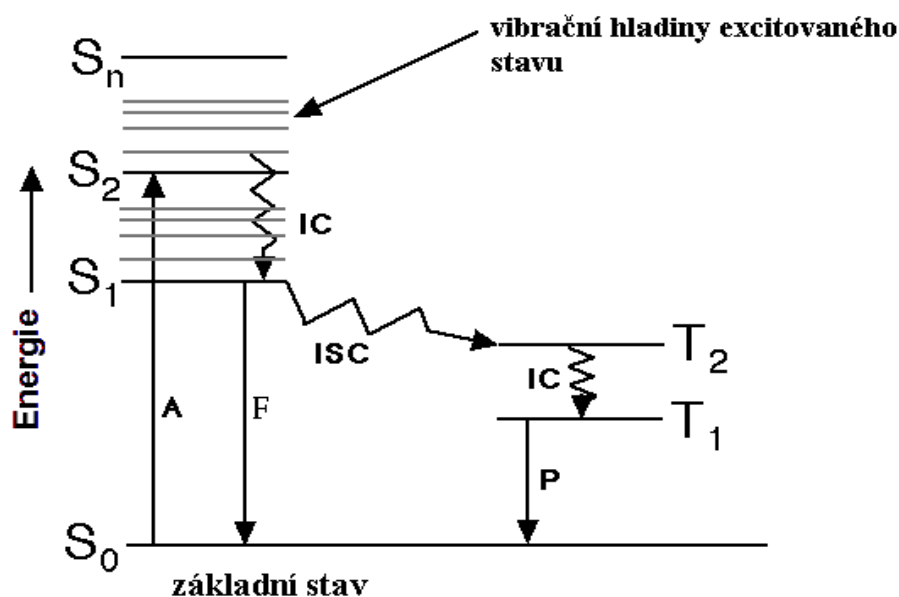
3. Použitá literatura.....	20
----------------------------	----

1. Úvod

1.1. Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopie je metoda založená na principu fluorescence. Při absorpci záření přechází molekula do excitovaného stavu. Ztrátou získané energie se potom vrací zpátky do základního stavu. Návrat do základního stavu může probíhat několika možnými způsoby: přenosem energie uvnitř molekuly včetně vyzáření části excitační energie, změnou geometrie molekuly, rozpadem molekuly a mezimolekulovým přenosem energie. Přenosy energie uvnitř molekuly mohou probíhat jako přeměna excitační energie na teplo nebo jako vnitřní konverze (internal conversion) či mezisystémový přechod (intersystem crossing) s následným vyzářením fotonu (luminiscence).^[1, 2]

Procesy, které následují po absorpci záření, bývají obvykle zobrazovány pomocí Jablonského diagramu (viz obr.).^[3]



Obr. 1: Jablonskiho diagram: S_0 – základní stav, S_1 , S_2 , S_n – excitované singletové stavy, T_1 , T_2 – tripletové stavy, IC – vnitřní konverze (internal conversion), ISC – mezisystémový přechod (intersystem crossing), A – absorpce, F – fluorescence, P – fosforescence.

Z obr. 1 je vidět, že luminiscence může být dvojího typu: fluorescence a fosforescence.

Fluorescence je emise záření z tzv. singletového stavu, to je stavu, jehož multiplicita je rovna jedné¹. Návrat do základního stavu je spinově povolený a dochází k rychlé emisi fotonu. Čas trvání fluorescence je asi 10 ns.

Fosforescence je emise záření z tzv. tripletového stavu, to je stavu, jehož multiplicita je rovna třem. Přechody mezi stavy s různou multiplicitou jsou spinově zakázané a k vyzáření dochází se zpožděním. Fosforescence se tedy obvykle objevuje milisekundy až desítky sekund po excitaci.^[4]

Při fluorescenční spektroskopii jsou molekuly vzorku excitovány vhodnou vlnovou délkou (excitační vlnová délka) a následně emitují záření o delší vlnové délce. Touto metodou lze provádět jak kvalitativní, tak i velmi citlivé kvantitativní analýzy např. průkazy existence různých interakcí. Při ozáření přechází molekula ze základního stavu do jedné z mnoha vibračních hladin vyššího singletového stavu. Excitované molekuly velmi rychle přejdou do několika nejnižších vibračních hladin stavu S_1 , odtud pak molekula zářivě přejde do základního stavu.^[5]

Počet molekul dané látky, které podléhají po absorpci záření fluorescenčnímu přechodu do základního stavu, charakterizujeme tzv. kvantovým výtěžkem. Kvantový výtěžek fluorescence je definován jako poměr počtu molekul, které podléhají fluorescenci, k celkovému počtu excitovaných molekul.^[1]

1.2. Albumin, histony a imunoglobuliny

1.2.1. Albumin

Albumin je nejhojnější bílkovinou lidské plazmy. Tvoří 60% z celkového obsahu bílkovin v krevní plazmě. Jeho syntéza probíhá v játrech. Relativní molekulová hmotnost albuminu je 66 300 Da. Na rozdíl od většiny ostatních proteinů vyskytujících se v tělních tekutinách není glykoproteinem. Jeho strukturu tvoří jeden polypeptidový řetězec, který obsahuje 3 homologické domény a 17 disulfidických vazeb. Molekula albuminu má elipsoidní tvar a proto nezvyšuje tolik viskozitu plazmy jako protáhlé molekuly. Jeho biologický poločas v plazmě je asi 20 dní.^[6]

1 Multiplicita stavu se počítá podle vztahu $2S + 1$, kde S je celkové elektronové spinové číslo. Pro stav, kdy všechny elektrony jsou spárované, je multiplicita stavu rovna jedné a stav se nazývá singletový. Pro stav, kdy je v systému 1 elektron, je multiplicita stavu rovna dvěma a stav se nazývá dubletový. Pro stav, kdy jsou v systému 2 elektrony, je multiplicita stavu rovna třem a stav se nazývá tripletový.

Albumin je hlavní složkou, která vytváří koloidní osmotický tlak plazmy. Ten je velmi důležitým determinantem rozdělení extracelulární tekutiny části intravaskulární a extravaskulární. Při hypoalbuminemii (snížená koncentrace albuminu v plazmě) se snižuje koloidní osmotický tlak a to narušuje rovnováhu mezi plazmou a mezibuněčnou tekutinou. Výsledkem je, že nedochází k přechodu mezibuněčné tekutiny zpátky do krve. Nahromadění této tekutiny v mezibuněčném prostoru se klinicky projeví jako edém. Ke snížení koncentrace albuminu v plazmě může docházet v různých případech. Příčinou může být jaterní onemocnění, snížená absorpce živin, podvýživa, otrava krve, hypoxémie. Další příčinou hypoalbuminemie může být zvýšená exkrece nebo degradace albuminu. To může být způsobeno nefrotickým syndromem, ztrátami proteinů v důsledku enteropatie (onemocnění střevního traktu), rozsáhlými popáleninami a krvácením, těžkými otravami, horečkou nebo výskytem zhoubných novotvarů.

Albumin plní také velmi důležitou transportní funkci, je přenašečem řady látek např. mastných kyselin, aminokyselin, lipidů, nekonjugovaného bilirubinu, thyroïdních hormonů, vitaminů, kovů, léků a toxických látek. Další jeho funkcí je funkce zásobní, protože při zátěži organismu slouží jako okamžitá bohatá rezerva aminokyselin, zvláště esenciálních.^[7]

1.2.2. Histony

Histony jsou skupina basických bílkovin vyskytující se v jádře eukaryotních buněk, kde vytvářejí reversibilní komplexy s DNA.^[8] Obsahují velký podíl kladně nabitých aminokyselinových zbytků, které jim umožňují tvořit iontovou vazbu se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA. Tvoří převážnou většinu proteinové složky chromatinu.

Stejně jako imunoglobuliny se rozdělují do pěti tříd označovaných H1, H2A, H2B, H3 a H4. V histonech H2A, H2B, H3 a H4 je sekvence aminokyselin pozoruhodně evolučně stabilní. Tyto čtyři histony tvoří vždy ve dvou kopiích oktamery, kolem kterých se obtáčí dvojšroubovicová DNA. Tím vznikají útvary zvané nukleosomy. Množství jejich molekul obsažených v chromatinu je zhruba stejné. Histon H1 je variabilnější, a přestože je také vázán na DNA, není součástí nukleosomů. V chromatinu se vyskytuje asi v polovičním množství než ostatní histony.

Histony podléhají posttranslační modifikaci, jejímž účelem je snížit celkový kladný náboj histonu a tím ovlivnit jeho interakci s DNA. Modifikace histonů nemají nic společného s regulací exprese eukaryotních genů.^[8, 10]

1.2.3. Imunoglobuliny

Imunoglobuliny jsou protilátky bílkovinné povahy vytvářené plasmatickými buňkami, které vznikají z B-lymfocytů po setkání s cizorodým antigenem. Proti tomuto antigenu se následně specializuje příslušný imunoglobulin.^[12] Primární funkcí imunoglobulinů je vázat specificky antigen. Dalšími biologickými aktivitami je schopnost vázat se na specializované buňky (např. fagocyty), prostup placentou nebo aktivace komplementu (po navázání se na antigenní povrch mají schopnost vázat protein C1, který se tímto aktivuje a je počátečním krokem k aktivaci dalších proteinů komplementu). Přítomnost imunoglobulinů v lidském organismu se využívá jako důkaz infekce. Vyskytují se v séru, intersticiální tekutině, v slzách, slinách, mateřském mléce a na povrchu sliznic a B-buněk (jako B-buňky jsou označována všechna vývojová stádia B-lymfocytů).^[11, 12, 13]

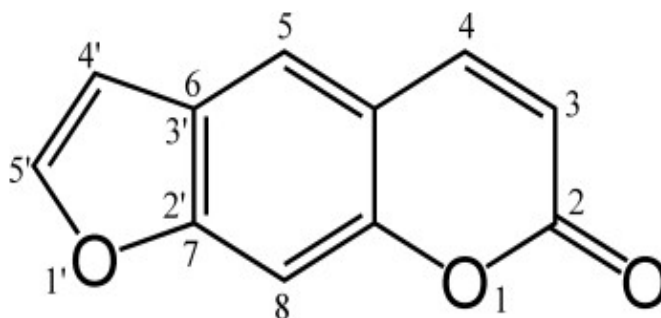
Základní stavební bloky imunoglobulinů jsou tvořeny čtyřmi podjednotkami: dvěma stejnými lehkými řetězci a dvěma stejnými těžkými řetězci. Podjednotky jsou navzájem spojovány disulfidickými můstky a nekovalentními interakcemi tak, že vzniká symetrický dimer ve tvaru Y. Imunoglobuliny tvoří skupinu příbuzných, ale odlišných proteinů, které se dělí do tříd. U lidí je těchto tříd pět a jsou označovány IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Jednotlivé třídy se od sebe liší přítomností různých typů těžkých řetězců, které jsou označovány α , δ , ϵ , γ , μ .^[13]

Různé třídy mají odlišné fyziologické funkce. IgM je produkován jako první odpověď na antigen. Objevuje se již 2 až 3 dny po prvním styku s antigenem. Vyskytuje se převážně v krvi a je neúčinnější v boji proti invazivním mikroorganismům. Jeho molekula je tvořena pěti dimerními podjednotkami spojenými disulfidickými můstky. IgG je nejčastější imunoglobulin a vyskytuje se ve stejném poměru v krvi a v intersticiální tekutině. Je to jediná protilátka, která má schopnost procházet placentou, a tím poskytovat plodu imunitu. Produkce IgG začíná 2 až 3 dny poté co se objeví IgM. IgA se váže na antigenní místa invazivních patogenů, čímž blokuje jejich připojení na vnější epiteliální povrchy. Proto se vyskytuje hlavně v trávicím traktu a sekretech jako jsou sliny, pot nebo slzy. Je také hlavní protilátkou v mateřském mléce a tím poskytuje kojencům ochranu proti gastrointestinálním infekcím způsobených patogeny. IgE se objevuje v krvi normálně pouze v nepatrné koncentraci. Je důležitý v alergických reakcích a v ochraně proti parazitům. IgD je v krvi rovněž přítomen pouze v nízké koncentraci a jeho funkce není přesně dosud známá.^[9]

1.3. Psoralen a PUVA terapie

1.3.1. Psoralen

Psoraleny obecně jsou tricyklické aromatické sloučeniny, vyskytující se buď v přírodě nebo jsou synteticky vyráběné. Přirozeně se vyskytuje například v čínské léčivé bylině *Psoralea corylifolia* L., v celeru, pastináku, citrusových plodech a dalších běžných rostlinách.^[14]



Obr. 2: Strukturní vzorec psoralenu.

Molekulu tvoří furan, který se vazebnými místy 2 a 3 váže na vazebná místa 6 a 7 kumarinu. Proto se psoralenům také často říká furokumariny. Jejich struktura je zodpovědná za jejich schopnost absorbovat UV záření, nejvíce v oblasti mezi 250 – 300 nm. Psoraleny vykazují fotobiologickou aktivitu, fotosenzitizaci kůže, která se na začátku projevuje zarudnutím a je následována tmavou pigmentací.^[15, 16]

Psoraleny interagují s různými biomolekulami. Interakce s nukleovými kyselinami probíhá ve dvou krocích: tvorba komplexu v základním stavu, kdy se psoralen vsune do šroubovice DNA. Druhým krokem je kovalentní vazba psoralenu na pyrimidinové báze nukleové kyseliny. Po ozáření UV-A zářením dochází k tvorbě monosloučenin. Formování těchto monosloučenin je ovlivněno konformačními změnami v dvojšroubovici DNA. K interakci mezi psoralenem a bílkovinami může docházet i bez přítomnosti světla, kdy vzniká kovalentní vazba. Tato interakce hraje důležitou roli ve farmakokinetice.^[15]

Základní chemické, absorpční a fluorescenční charakteristiky vybraných derivátů psoralenu jsou shrnuty v tab. I.^[17] Z tab. I je zřejmé, že psoralen a jeho deriváty jsou látky špatně (pokud vůbec) rozpustné ve vodě, mají výrazná absorpční maxima v oblasti kolem 300 nm, mnohé vykazují intenzivní fluorescenci a jejich fluorescenční maxima jsou ve viditelné oblasti spektra.

Tab. I: Základní chemické, absorpční a fluorescenční charakteristiky vybraných derivátů psoralenu (λ_{\max} – vlnová délka absorpčního maxima, ϵ_{\max} – molární absorpční koeficient, Φ_t , λ_p - charakteristiky tripletového stavu).

Psoralen	Rozpouštědlo	Rozpustnost ve vodě (mg/l)	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}	Φ_t	λ_p (nm)
8-methoxypsoralen (8-MOP)	voda	23	246	21,000	0,06	
			303	12,014		
	ethanol		299		0,04	456,5
5-methoxypsoralen (5-MOP)	voda	5	312	14,200	<0,01	
	ethanol		335		0,1	472
Trimethylpsoralen (TMP)	voda	1	250	15,000	0,09	446,5
			298	7,950		
			335			
4,5'-dimethylangelicin (4,5'-DMA)	voda	8	298	9,350		
			365			
3-carbethoxypsoralen (3-Cps)	voda	13	247		0,35	504
			318	10,900		
			365			
Dimethoxykumarin (DMC)	voda		327		0,072	476
			324	15,150		
Psoralen (Ps)	voda	37	330		0,13	456
			244		0,06	
			295			
			335			
Angelicin	voda	20	246			
			300	9,530		
Aminomethyltrimethyl psoralen (AMT)	voda	>10 000	256			
			303			
			336			
Pyridopsoralen (PyPs)	ethanol		310		0,04	437
			327	6,500		
			330	6,700		
Methylpyridopsoralen (MePyPs)	ethanol		308	8,000	0,02	442
			330			
			330	8,300		
Kumarin	voda	5 000	313	3,100		459,8

1.3.2. PUVA terapie

Principem metody PUVA je využití fotochemicky iniciovaných interakcí psoralenů s biomolekulami po excitaci UVA zářením nejčastěji v rozmezí vlnových délek 340 – 370 nm. Nejběžněji používané jsou 8-methoxypsoralen a 4, 5, 8-trimethylpsoralen. Tyto dva psoraleny mají schopnost spojovat svými molekulami pyrimidinové části dvojšroubovice DNA. Po podání samotného psoralenu není tato vazba kovalentní a nemá žádný biologický význam. Po ozáření UVA zářením se však vazba fixuje a vzniká vazba kovalentní. Důsledkem je ztráta schopnosti replikace. Při PUVA terapii je však využíváno i dalších jejích účinků, mezi které patří např. selektivní cytotoxicita vůči mononukleárům (skupina leukocytů s oválným jádrem – lymfocyty a monocyty) nebo navození apoptózy T- buněk (jako T-buňky jsou označována všechna vývojová stádia T-lymfocytů).^[18, 19]

Deriváty psoralenu se aplikují buď orálně či povrchově. Místní povrchová aplikace bývá upřednostňována u pacientů s poruchou funkce jater nebo gastrointestinálního traktu, šedým zákalem, dále také v případě, že psoralen interaguje s nějakými současně užívanými léky. Bývá také přednostně aplikována u dětí. U obou aplikací je potřeba dobře zvážit indikaci k léčbě, stav pacienta před léčbou, velikost dávky psoralenu, správné načasování léčby a u lokální aplikace způsob podání - psoralenové preparáty lze podávat ve formě masti, roztoku či lázně.^[20]

PUVA terapie může být využita například v léčbě následujících onemocněních.

- Psoriasis (lupenka) je běžné dědičné onemocnění kůže. Léčba je až v 90% úspěšná. Výhodou je, že v případě, kdy se znovu objeví příznaky, může být PUVA použita opakovaně. Psoralen je podáván orálně nebo lokálně.
- Ekzémy, dermatitidy jsou touto metodou léčeny s poměrně dobrou úspěšností. Psoralen je podáván lokálně, většinou ve formě masti.
- Mycosis fungoides je poměrně vzácná kožní forma lymfomu T-buněk, která vyvolává vyrážku. Léčba bývá úspěšná v případě, že je opakována. Pokud se přeruší, příznaky se často objeví znovu.
- Citlivost na světlo (polymorphic light eruption - PMLE) je běžná porucha. U tohoto onemocnění je PUVA aplikována vždy na jaře a poskytuje pacientům ochranu obvykle po celý zbytek léta.
- Vitiligo je onemocnění, kdy pacienti mají na kůži zcela bílé skvrny bez pigmentace. Léčba může být aplikována pouze v některých případech, většinou u pacientů s tmavší pokožkou. U pacientů se světlou pokožkou nejsou výsledky příliš efektivní, protože opakovaním léčby se skvrny více zvýrazní díky zhnědnutí okolní kůže.^[21, 22]

1.4. Interakce malých molekul s bílkovinami

Interakce nízkomolekulárních látek s bílkovinami jsou důležité z mnoha metabolických i terapeutických hledisek. Příkladem metabolicky důležitého typu těchto interakcí může být interakce tetrapyrolových látek (např. bilirubinu) s lidským sérovým albuminem^[23], je to totiž jediná cesta, jak se bilirubin, který vzniká ve tkáních rozpadem hemoglobinu, dostává do jaterních buněk, kde je konjugován s kyselinou glukuronovou a poté vylučován z organismu.^[24]

Další známou interakcí lidského sérového albuminu je interakce s hemem. Dochází k ní pouze za patologických podmínek při těžkých hemolýzách, kdy se v krevním oběhu vyskytuje velké množství volného hemoglobinu.^[23, 25]

Jako příklad terapeuticky využívaných interakcí nízkomolekulárních látek s bílkovinami jsou interakce sérového albuminu, γ -globulinové frakce a histonů s několika ftalocyaniny, které se liší v celkovém náboji molekuly.^[26] Díky svojí schopnosti kumulovat se v nádorových buňkách a tvořit reaktivní formy kyslíku se ftalocyaniny jeví jako vhodné k využití ve fotodynamické terapii (PDT). Tato terapie využívá reaktivních forem kyslíku k poškození nádorových buněk tím, že znemožní jejich replikaci nebo dělení. Chemoterapeutika (např. ftalocyaniny) se při PDT do míst jejich působení dostávají krevním řečištěm.^[27] Znalost interakce mezi plazmovými bílkovinami a těmito sloučeninami je velmi důležitá, stejně jako skutečnost, zda dochází k interakci mezi chemoterapeutiky a jadernými bílkovinami buněk cílových tkání.^[26]

2. Experimentální část

2.1. Materiály a metody

Na provedení pokusu byl použit lidský albumin, frakce V, 96 – 99% , histon typ H2A z telecího thymu, 8-Methoxypsoralen, fosfátový pufr, všechny zakoupené od firmy SIGMA. Dále bylo použito Q-RAHu IgM (králičí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgM) 6,9 M od firmy SEVAC, TRIS (hydroxymethylaminomethan) čistý, HCl p.a. od firmy LACHEMA a metanol pro HPLC od firmy FLUKA.

Deionizovaná voda, která byla používána na přípravu všech roztoků bílkovin, psoralenu a pufrů byla vyrobena přístrojem Milli-Q, Millipore Waters.

Roztok 8-methoxypsoralenu (dále jen 8-MOP) byl připraven rozpuštěním 2,5 mg psoralenu ve 20 ml methanolu. Navážky pro jednotlivé pokusy se pohybovaly v rozmezí 2,5 – 2,7 mg. Pro důkladné rozpuštění bylo použito ultrazvukové lázně NETZ K-1.

Pro měření interakce 8-MOP s albuminem byl použit pufr TRIS-HCl o koncentraci 0,2 mol/l a pH=8,2. Byl připraven rozpuštěním 2,40 g TRISu ve 100 ml deionizované vody. Následně bylo upraveno pH tohoto roztoku postupným přidáváním 1 M HCl až na požadovanou hodnotu. Roztok albuminu byl připraven rozpuštěním 4,2 mg albuminu v 10 ml 0,2 M TRISu.

Fosfátový pufr o koncentraci 0,01 mol/l a pH=7,4 pro ředění roztoku IgM byl připraven rozpuštěním 124 mg fosfátového pufru ve 100 ml deionizované vody. 817 mg chloridu sodného na 100 ml roztoku pufru bylo přidáno podle návodu k ředění IgM od výrobce - koncentrace NaCl byla 0,14 mol/l.

Roztok histonu H2A o koncentraci $1,67 \times 10^{-4}$ mol/l byl připraven rozpuštěním 2,5 mg histonu v 10 ml 0,01 M fosfátového pufru bez přídavku NaCl.

Pro měření interakce albuminu s 8-MOP byly připraveny vzorky následujícím způsobem:

Do kyvety jako vzorek 1 byl dán samotný 0,2 M TRIS. Vzorek 2 byl připraven smícháním 5ml roztoku TRISu a 33 μ l $6,2 \times 10^{-4}$ M roztoku 8-MOP. Jako vzorek 3 byl do kyvety dán roztok albuminu v TRISu. Poslední vzorek 4 byl připraven smícháním 5 ml roztoku albuminu v TRISu a 33 μ l roztoku 8-MOP. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v tab. II

Tab. II: Složení vzorků pro test interakce albuminu s 8-MOP

Vzorek 1	TRIS
Vzorek 2	TRIS 5 ml + psoralen 33 μ l
Vzorek 3	Albumin v TRISu
Vzorek 4	Albumin v TRISu 5 ml + psoralen 33 μ l

Pro měření interakce histonu H2A s 8-MOP byly připraveny vzorky následujícím způsobem:

Vzorek 1 byl samotný 0,01 M fosfátový pufr. Vzorek 2 byl připraven smícháním 5 ml fosfátového pufru s 33 μ l $6,0 \times 10^{-4}$ M roztoku 8-MOP. Vzorek 3 byl roztok histonu H2A v pufru. Vzorek 4 byl připraven smícháním 5 ml vzorku 3 s 33 μ l roztoku 8-MOP. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v tab. III.

Tab. III: Složení vzorků pro test interakce histonu H2A s 8-MOP.

Vzorek 1	Fosf. pufr
Vzorek 2	Fosf. pufr 5 ml + 8-MOP 33 μ l
Vzorek 3	Histon H2A ve fosf. Pufru
Vzorek 4	Histon H2A ve fosf. pufru 5 ml + 8-MOP 33 μ l

Pro měření interakce IgM s 8-MOP byly připraveny vzorky následujícím způsobem:

Vzorek 1 byl připraven odměřením 3 ml 0,01 M fosfátového pufru do kyvety. Vzorek 2 vznikl přidáním 50 μ l $6,0 \times 10^{-4}$ M roztoku 8-MOP ke vzorku 1. Vzorek 3 byl připraven přidáním 30 μ l roztoku 6,9 M IgM ke vzorku 2. Vzorek 4 vznikl přidáním 30 μ l IgM k 3050 μ l fosfátového pufru. V tomto případě bylo použita odlišná příprava než u předchozích dvou bílkovin, protože IgM byl k dispozici pouze ve formě roztoku o koncentraci 6,9 M. Tento koncentrovaný roztok byl přímo přidáván do vzorků. Příprava se od předchozích postupů lišila, aby nedošlo k většímu naředění IgM ve vzorku 4 než ve vzorku 2. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v tab. IV.

Tab. IV.: Složení vzorků pro test interakce IgM s 8-MOP.

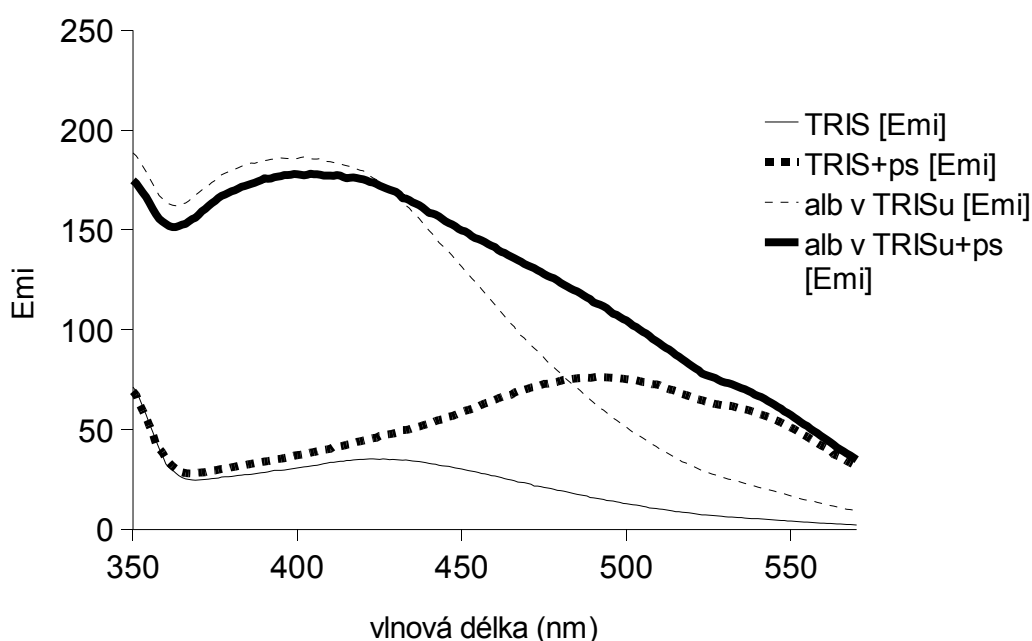
Vzorek 1	Fosf. pufr 3000 μ l
Vzorek 2	Vzorek 1 + psoralen 50 μ l
Vzorek 3	Vzorek 2 + IgM 30 μ l
Vzorek 4	Vzorek 4 + IgM 30 μ l

U všech připravených vzorků byla změřena fluorescenční spektra. Měření fluorescenčních spekter bylo prováděno na spektrofluorimetru SHIMADZU RF-1501 řízeném počítačovým programem Panorama fluorescence 1.1. Pro všechny pokusy byla použita excitační vlnová délka 300 nm. Pro měření byla používána fluorescenční kyveta o délce 1 cm.

K navažování byly používány analytické váhy AND GR-200.

2.2. Výsledky

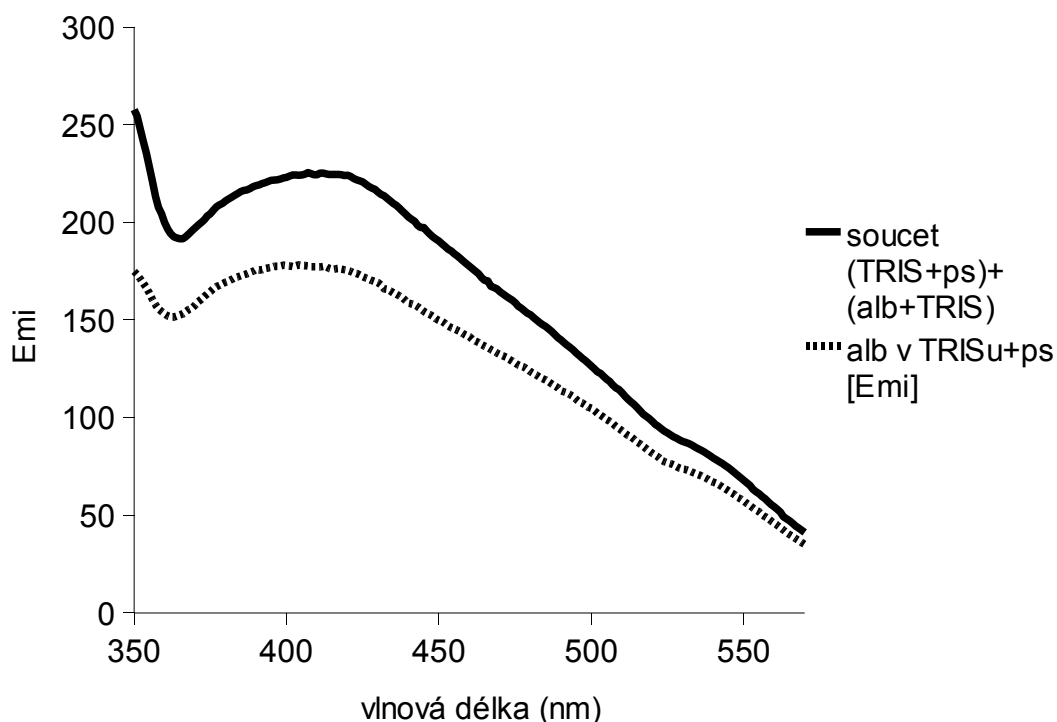
Pro prokazování existence interakce 8-MOP s jednotlivými bílkovinami byla měřena fluorescenční spektra jednotlivých systémů bílkovin tak, že byla proměřena fluorescence samotného pufru, fluorescence samotné bílkoviny v pufru, fluorescence 8-MOP v pufru a fluorescence bílkoviny v pufru po přidavku 8-MOP. Pro systém albumin – 8-MOP jsou získaná fluorescenční spektra znázorněna na obr. 3.



Obr. 3: Fluorescenční spektra při testu interakce albuminu s 8-MOP. Na ose y je vynášena relativní intenzita fluorescence, Emi.

Z obr. 3 je vidět, že u fluorescenčního spektra samotného TRISu je nepatrné fluorescenční maximum u 425 nm. Ve fluorescenčním spektru vzorku obsahujícího přídavek 8-MOP v TRISu se u 490 nm objevuje fluorescenční maximum 8-MOP. U spektra roztoku albuminu v TRISu je fluorescenční maximum u 402 nm. U spektra vzorku, kdy byl v roztoku přítomen albumin i 8-MOP, se fluorescenční maximum albuminu posunulo k 405 nm. Protože v oblasti fluorescenčního maxima 8-MOP v systému s albuminem nešlo rozhodnout, zda došlo k modifikaci psoralenového maxima či zda výsledné spektrum je pouze součtem dílčích

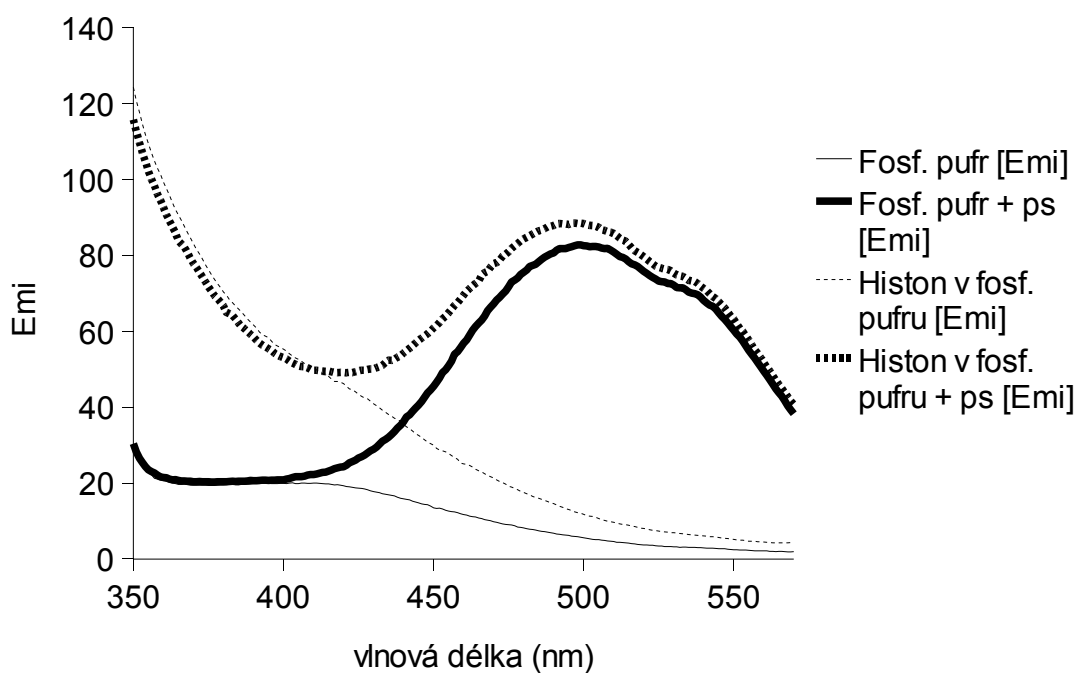
fluorescenčních spekter albuminu a 8-MOP, bylo vytvořeno teoretické spektrum dané součtem spektra vzorku obsahujícího samotný albumin v pufru a spektra vzorku, který obsahoval v pufru přídavek 8-MOP. Toto spektrum je na obr. 4 porovnáno s naměřeným spektrem systému albumin – 8-MOP.



Obr. 4: Fluorescenční spektrum vytvořené ze součtu spektra albuminu v TRISu a 8-MOP v TRISu v porovnání se spektrem albuminu v TRISu s přídavkem 8-MOP. Na ose y je vynesena relativní intenzita fluorescence, Emi.

Z grafu na obr. 4 je jasně vidět, že tyto dvě fluorescenční spektra se od sebe výrazně liší. Došlo ke změně intenzity fluorescence v celém měřeném rozsahu vlnových délek, nejvýrazněji v oblasti u 410 nm. U spektra vytvořeného součtem dvou naměřených spekter je maximum u 407 nm. U spektra náležícího vzorku, který obsahoval albumin i 8-MOP, je fluorescenční maximum u 399 nm. Došlo tedy k posunu maxima o 8 nm.

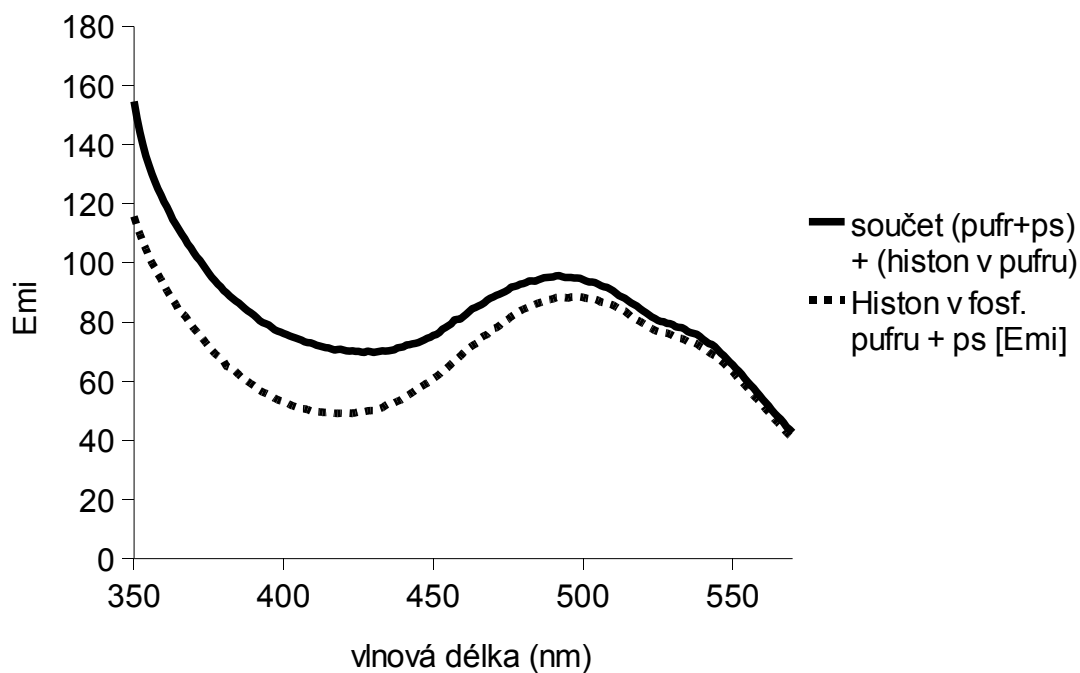
Na obr. 5 jsou fluorescenční spektra vzorků, které byly měřeny při testu interakce histonu H2A s 8-MOP.



Obr. 5: Fluorescenční spektra při testu interakce histonu H2A s 8-MOP.

Na ose y je vynesena relativní intenzita fluorescence, Emi.

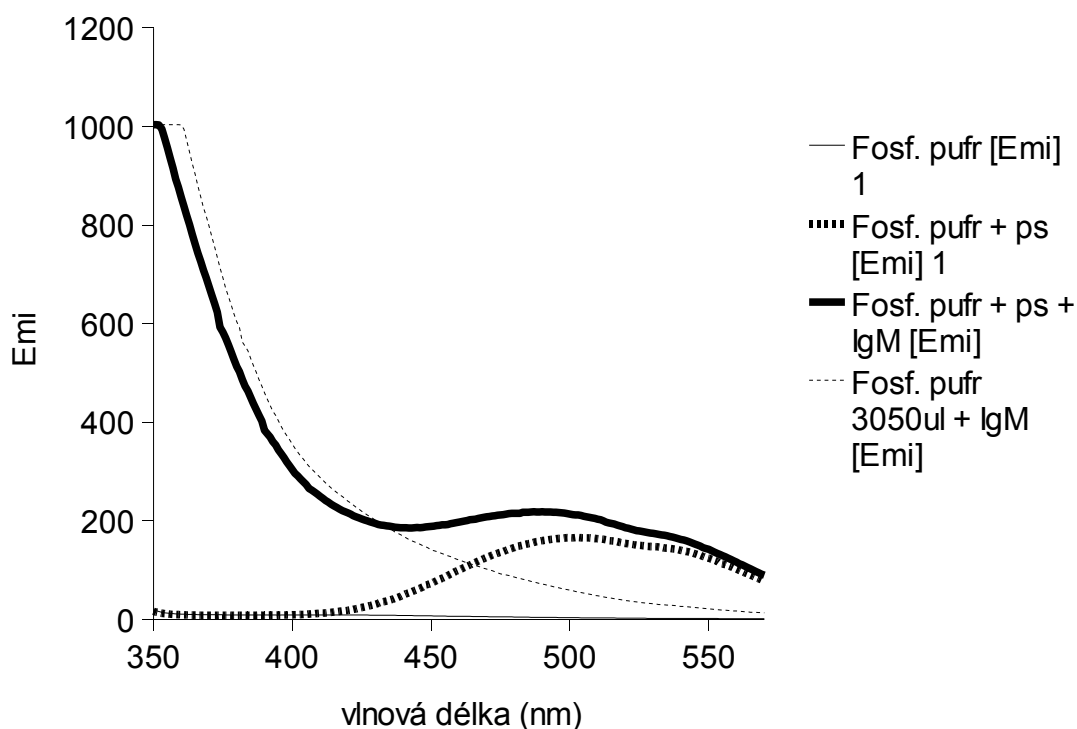
Z obr. 5 je patrné, že fluorescenční spektrum náležící roztoku samotného fosfátového pufru má opět pouze nepatrné fluorescenční maximum u 403 nm. U druhého vzorku, který obsahoval přídavek 8-MOP je u 499 nm fluorescenční maximum 8-MOP. U spektra vzorku histonu H2A ve fosfátovém pufru není vidět žádné maximum, intenzita fluorescence se zvyšuje směrem ke kratším vlnovým délkám. Spektrum vzorku, který obsahoval histon H2A ve fosfátovém pufru a přídavek 8-MOP, vykazuje v oblasti 450 – 550 nm podobný průběh jako samotný 8-MOP v pufru, v oblasti od 450 nm směrem ke kratším vlnovým délkám je intenzita fluorescence obdobná jako u spektra samotného histonu H2A v pufru. V oblasti fluorescenčního maxima 8-MOP v systému s histonem H2A opět nebylo možné posoudit, zda došlo k modifikaci psoralenového maxima nebo zda je výsledné spektrum pouze součtem dílčích spekter histonu H2A a 8-MOP, bylo proto stejně jako u předchozího pokusu vytvořeno teoretické spektrum. Na obr. 6 je toto spektrum porovnáno s naměřeným spektrem systému histon H2A – 8-MOP.



Obr. 6: Fluorescenční spektrum vytvořené ze součtu spektra histonu H2A ve fosfátovém pufru a spektra fosfátového pufru s přidavkem 8-MOP v porovnání se spektrem histonu H2A ve fosfátovém pufru s přidavkem 8-MOP. Na ose y je vynesena relativní intenzita fluorescence, Emi.

Z obr. 6 je patrná změna intenzity fluorescence v celém měřeném rozsahu. Nejvíce v oblasti kolem 410 nm. Dále došlo k posunu fluorescenčního maxima 8-MOP z 492 nm v teoretickém spektru na 497 nm ve spektru vzorku obsahujícího histon H2A i 8 - MOP. Došlo tedy k posunu fluorescenčního maxima o 5 nm a opět také ke změně intenzity fluorescence.

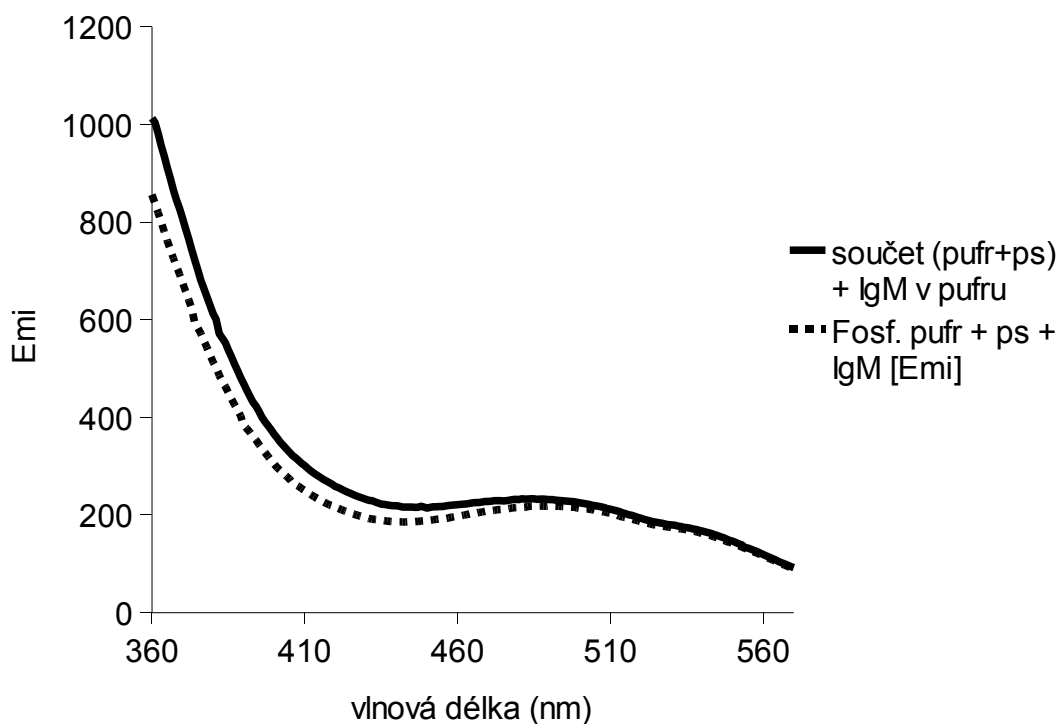
Na obr. 7 jsou čtyři fluorescenční spektra, která byla naměřena u testu interakce imunoglobulinu M s 8-MOP.



Obr. 7: Fluorescenční spektra při testu interakce IgM s 8-MOP. Na ose y je vynesena relativní intenzita fluorescence, Emi.

Z obr. 7 je vidět, že u těchto vzorků je výrazně (až řádově) větší intenzita fluorescence. U spektra samotného fosfátového pufru, proto není patrné žádné maximum. Spektrum fosfátového pufru s přidavkem 8-MOP má výrazné fluorescenční maximum u 503 nm. Spektrum náležící vzorku, který obsahoval ve fosfátovém pufru přidavek IgM i 8 - MOP, má fluorescenční maximum u 490 nm. U spektra vzorku IgM ve fosfátovém pufru nevidíme žádné maximum. Intenzita fluorescence se stejně jako u histonu H2A zvyšuje směrem ke kratším vlnovým délkám. Jako v předchozích dvou případech nebylo opět možno posoudit, zda došlo k modifikaci psoralenového fluorescenčního maxima, proto bylo opět vytvořeno teoretické spektrum dané součtem spektra vzorku obsahujícího pouze IgM v pufru a spektra vzorku, který obsahoval ve fosfátovém pufru přidavek 8-MOP. Toto spektrum je na obr. 8 porovnáno s naměřeným spektrem systému IgM – 8-MOP.

Z obr. 8 je vidět změna intenzity fluorescence jako u histonu H2A v oblasti kolem 410 nm. K posunu fluorescenčního maxima 8-MOP došlo z 484 nm ve spektru vzniklého součtem na 490 nm, které je patrné ve spektru vzorku obsahujícího přidavek IgM i 8-MOP.



Obr. 8: Součet spekter vzorku obsahujícího 8-MOP ve fosfátovém pufru a vzorku obsahujícího IgM v pufru v porovnání se spektrem vzorku obsahujícího zároveň přídavek Ig M i 8-MOP. Na ose y je vynesena relativní intenzita fluorescence, Emi.

2.3. Diskuse

Rozhodující pro vyhodnocení, zda dochází či nedochází k interakci mezi 8-MOP a studovanými bílkovinami, je skutečnost, zda se mění spektrální charakteristiky, tedy zda dochází ke změně intenzity nebo k posunu maxim měřených spekter.^[23, 24]

Ke zhodnocení těchto případných změn poslouží porovnání vzorku, který obsahuje v příslušném pufru přídavek 8-MOP a zároveň jednu ze tří testovaných bílkovin a součet vzorků, kdy jeden obsahuje přídavek jedné bílkoviny a druhý obsahuje přídavek 8-MOP. Tedy porovnání těchto spekter tak, jak ukazuje pro albumin obr. 4, pro histon H2A obr. 6 a pro IgM obr. 8.

Pokud by nedocházelo k žádné interakci, nedošlo by po přidání 8-MOP k albuminu ke změně fluorescence a dvě křivky na obr. 4 by se od sebe nelišily. Jak ale vidíme z obr. 4, v přítomnosti 8-MOP se mění fluorescenční maximum albuminu. Z podrobného rozboru hodnot intenzity náležejících jednotlivým vlnovým délkám byl zjištěn posun maxima fluorescence albuminu v přítomnosti 8-MOP o 8 nm směrem ke kratším vlnovým délkám. Dále je změněna i intenzita fluorescence v celém měřeném rozsahu a nejvíce v oblasti fluorescenčního maxima albuminu, kde dochází v naměřeném spektru oproti teoretickému spektru k poklesu intenzity přibližně o 21 %. Bylo modifikováno i fluorescenční maximum 8-MOP a pokles intenzity v této oblasti je asi 19 %. Tyto změny jsou důsledkem interakce mezi albuminem a 8-MOP.

Spektra znázorněná na obr. 6 by pokud by nedocházelo k interakci mezi histonem H2A a 8-MOP, opět zůstala stejná. Z obr. 6 je ale patrné, že se spektra od sebe liší. Protože v měřené oblasti nemá samotný histon H2A žádné fluorescenční maximum, dochází pouze ke změně fluorescenčního maxima 8-MOP. Z hodnot intenzity náležejících vlnovým délkám byl patrný posun o 5 nm směrem k delším vlnovým délkám a opět došlo i ke změně intenzity fluorescence v této oblasti. Pokles intenzity fluorescence měřeného spektra oproti teoretickému spektru v oblasti fluorescenčního maxima 8-MOP je 9 %. K výraznému poklesu také došlo v oblasti kolem 410 nm, zde došlo k poklesu asi o 32 %. Obě změny poukazují na interakci mezi histonem H2A a 8-MOP.

Na obr. 8 vidíme, že i tato dvě spektra se od sebe liší. Protože ani IgM nemá v měřené oblasti fluorescenční maximum je opět pozměněno pouze fluorescenční maximum 8-MOP. Pokud by nedocházelo k interakci mezi IgM a 8-MOP, fluorescenční maximum by zůstalo stejné jako v případě, kdy byl ve vzorku pouze samotný 8-MOP. Jak ale bylo zjištěno z hodnot odpovídajících jednotlivým vlnovým délkám došlo k jeho posunu o 6 nm směrem k delším vlnovým délkám. Opět pozorujeme i změnu intenzity fluorescence, která je nejvýraznější v oblasti kolem 420 nm, kde došlo v naměřeném spektru oproti teoretickému spektru k poklesu přibližně o 16 %. Tyto změny dokazují, že k interakci mezi IgM a 8-MOP dochází.

Je tedy patrné, že u všech tří testů došlo k interakci mezi testovanou bílkovinou (lidským albuminem, histonem H2A, IgM) a 8-MOP.

V dalším kroku ve studiu těchto interakcí by měla být kvantifikace, tj. kolik molekul psoralenu se váže na jednu molekulu bílkoviny.^[23, 26] Na tento test by bylo vhodné použít například metodu fluorimetrické titrace. K nezávislému potvrzení interakce by mohly sloužit metody jako cirkulární dichroismus, případně nové aplikace hmotnostní spektroskopie či nukleární magnetická rezonance.

2.4. Závěr

Metodou fluorescenční spektroskopie byla prokázána interakce mezi 8-MOP a všemi studovanými bílkovinami, tj. lidským albuminem, histonem H2A a imunoglobulinem M. V systému 8-MOP – albumin byl zjištěn posun fluorescenčního maxima albuminu a změna intenzity fluorescence, v systémech 8-MOP – histon H2A a 8-MOP - IgM došlo k posunu fluorescenčního maxima 8-MOP a ke změně intenzity fluorescence.

3. Použitá literatura

1. C. E. Wayne, R. P. Wayne: Basic Principles of Photochemistry.
V *Photochemistry*, pp. 1 – 18. Oxford University Press, Oxford 1996.
2. P. Suppan: The Chemistry of Excited Molecules.
V *Chemistry and Light*, pp. 87 – 94. The Royal Society of Chemistry, Bodmin 1994.
3. Jablonski diagram
[<http://web.uvic.ca/ail/techniques/epi-fluorescence.html>], 7. 11. 2009.
4. Instruction Manual RF-1501 SHIMADZU Spectrofluorophotometer (P/N 206-62901).
SHIMADZU CORPORATION 1994.
5. Fluorescence spectroscopy
[http://www.oswego.edu/~kadima/CHE425/CHE425L/FLUORESCENCE_SPETROSCOPY_08.pdf], 12. 10. 2009.
6. Albumin
[<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/JAACH.htm>], 29. 10. 2009
7. William J Marshall: Plasma Proteins.
V *Clinical Chemistry*, pp. 201 – 212. Butler & Tanner Ltd., London 1995.
8. D. Voet, J. G. Voetová: Expres eukaryotních genů.
V *Biochemie*, pp. 1160 – 1201. Victoria Publishing a.s., Praha 1995.
9. D. Voet, J.G. Voetová: Molekulová fyziologie.
V *Biochemie*, pp. 1227 – 1287. Victoria Publishing a.s., Praha 1995.
10. Youngson, Robert M.: *Collins Dictionary of Human Biology*.
HarperCollins, Glasgow 2006.
11. Prof. RNDr. Josef Košťiř: *Biochemie známá i neznámá*. Avicenum, Praha 1980.

12. MUDr. Martin Vokurka, Csc., MUDr. Jan Hugo a kolektiv: *Praktický slovník medicíny*. Maxdorf, Praha 2000.
13. Václav Hořejší Jiřina Bartůňková: Antigenně specifické receptory.
V *Základy imunologie*, pp. 56 – 65. Triton, Praha 2005.
14. Scott B.R., Pathak M.A., Mohn G.R.: Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions.
Mutation Research, 39 (1), 29 – 74, 1976.
15. Dall' Acqua F., Vedaldi D.: The Molecular Basis of Psoralen Photochemotherapy.
V *Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, pp.1357 – 1366.
Eds.: Horspool W.M., Song P. - S., Crc Press Inc., 1995.
16. Gasparro F. P.: 8-Methoxypsoralen Molecular Biology.
V *Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, pp. 1367 – 1373
Eds.: Horspool W.M., Song P. - S., Crc Press Inc., 1995.
17. Shim S. C.: Photochemistry of Skin-Sensitizing Psoralens
V *Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, pp. 1347 – 1356
Eds.: Horspool W.M., Song P. - S., Crc Press Inc., 1995.
18. PUVA terapie
[http://www.linkos.cz/odbornici/vzdelavani/2_00/01.php], 23. 11. 2009.
19. Lysenko E.P., Pliquet F., Wunderlich S.: Psoralen – photosensitized disaggregation of HeLa Cx43 spheroids
[<http://Photobiology.com/photobiology2000/lysenko/index.htm>], 25. 10. 2009.
20. Halpern S.M., Anstey A.V., Dawe R.S., Diffey B.L., Farr P.M., Ferguson J., Hawk J.L.M., Ibbotson S., McGregor J.M., Murphy G.M., Thomas S.E. And Rhodes L.E.: Guidelines for topical PUVA: a report of a workshop of the British Photodermatology Group.
British Journal of Dermatology, 142, 22 – 31, 2000 .

21. PUVA therapy
[<http://dermnetnz.org/procedures/puva.html>], 23. 11. 2009.
22. Psoriasis
[<http://www.psoriasis.org/netcommunity/sublearn03>], 23. 11. 2009.
23. Hrkal Z., Klementová Š.: Bilirubin and Haeme Binding to Human Serum Albumin Studied by Spectroscopy Methods
Int. J. Biochem., 16 (7), 799 – 804, 1984.
24. Voet, J. G. Voetová: Metabolismus aminokyselin.
V *Biochemie*, pp. 760 – 812. Victoria Publishing a.s., Praha 1995.
25. Zunszain P.A., Chuman J., McDonagh A.F., Curry S.: Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IX alpha
Journal of Molecular Biology, 381 (2), 394 – 406, 2008.
26. Klemetova S., Tothova D., Revakova R., Kaskova M. And Wagnerova D.M.: Phthalocyanines Sensitized Fragmentation of Proteins
Res. J. Chem. Environ., 5 (1), 13 – 18, 2001.
27. Bartošová J. Kalousek I., Hrkal Z.: Binding of meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphine to haemopexin and albumin studied by spectroscopy methods.
International Journal of Biochemistry, 26 (5), 631 – 637, 1994.