

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Klinická a toxikologická analýza



Bc. Veronika Felklová

Studium přípravy fluorescenčně značeného bilirubinu

Study of fluorescent labelled bilirubin preparation

Diplomová práce

Školitel: Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Libor Vitek, Ph.D., MBA

Praha, 2013

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité literární prameny. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. 5. 2013

Veronika Felková

Abstrakt

Hem je prostetická skupina obsahující atom železa ve středu tetrapyrolového kruhu, který je součástí krevního barviva hemoglobinu. Při metabolismu hemu pomocí enzymu hemoxygenasy vzniká v prvním kroku biliverdin – lineární tetrapyrol, který je ihned biliverdinreduktasou přeměněn na žlučové barvivo bilirubin. Tento tetrapyrolový pigment se denně uvolňuje do systémové cirkulace. Normální hladina nekonjugovaného bilirubinu v plazmě je u dospělého člověka 5 – 17 $\mu\text{mol/l}$, při extrémně zvýšených hladinách (nad 340 $\mu\text{mol/l}$) díky své lipofilitě působí cytotoxicky, zejména v novorozeneckém období může dojít až k rozvoji bilirubinové encefalopatie. Patogeneze této obávané komplikace není zcela jasná, chybí přesné informace o transportu nekonjugovaného bilirubinu přes hematoencefalickou bariéru i o cílových strukturách v centrálním nervovém systému. Cílem této práce je proto studium nových metod, které by umožnily detailnější výzkum distribuce bilirubinu v živých systémech. Jako vhodná metoda se jeví fluorescenční značení tetrapyrolového pigmentu v poloze C10, kdy se nejméně zasáhne do prostorového uspořádání molekuly a neovlivní se její fyzikálně-chemické vlastnosti a tím i její biologická aktivita. Vzhledem k faktu, že fluorescenčně značené molekuly lze využít i k *in vivo* experimentům za použití moderních zobrazovacích systémů, jeví se tento přístup jako velice výhodný ke studovanému účelu.

Klíčová slova: Bilirubin, fluorescenční značení, tetrapyrol, toxicita bilirubinu

Abstract

Heme is a prosthetic group containing iron atom at the center of the tetrapyrrole cycle, which is the part of hemoglobin. Heme is metabolized by heme oxygenase to linear tetrapyrrolic pigment – biliverdine. It is immediately transformed to bilirubin by biliverdin reductase. This pigment is excreted daily into the systematic circulation. Normal levels of unconjugated bilirubin in plasma are 5 - 17 $\mu\text{mol/l}$ for adult. At extremely elevated levels (above 340 $\mu\text{mol / l}$) causes cytotoxic due to its lipophilicity, especially in the neonatal period can lead to the development of bilirubin encephalopathy. The pathogenesis of this complication is not clear, there is no precise information of the transport of unconjugated bilirubin across the blood-brain barrier as well as target structures in the central nervous system. Distribution of unconjugated bilirubin in newborns is still not entirely clear. The aim of this work is to discover new methods which would allow more detailed investigation of distribution of bilirubin in living systems. A suitable method appears to be fluorescent labelling of tetrapyrrole pigment in position C10 which reaches into the spatial arrangement of the molecule, and does not affect its physicochemical properties and thus its biological activity. The fluorescence-labeled molecules can also be used for *in vivo* experiments for the use of modern imaging systems, this approach appears to be very beneficial to the studied purpose. .

Key words: Bilirubin, fluorescent labelling, tetrapyrrol, bilirubin toxicity

Poděkování

Děkuji mému školiteli Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. za vedení mé diplomové práce, za rady a pomoc. Dále děkuji Prof. MUDr. Liboru Vítkovi, Ph.D., MBA za cenné poznatky a optimistický přístup, RNDr. Martinu Štíchovi za vytrvalé měření MS spekter, Mgr. Martinu Dračínskému, Ph.D. za měření NMR spekter, Prof. Dr. Marii Urbanové, Ph.D. za měření ECD a IR spekter. Také děkuji kolektivu pracovníků nejen z Katedry organické a jaderné chemie za skvělé pracovní prostředí a rodičům za bezvýhradnou podporu a pomoc v celé době studia.

OBSAH

Seznam použitých zkratek.....	8
Cíl diplomové práce.....	10
1. Teoretická část.....	11
1. 1. Žlučové pigmenty.....	11
1. 1. 1. Klasifikace.....	11
1. 1. 2. Katabolismus hemu.....	11
1. 1. 3. Fyzikálně – chemické vlastnosti bilirubinu.....	12
1. 1. 4. Ranarubin.....	16
1. 1. 5. Hmotnostní spektrometrie bilirubinu.....	17
1. 2. Fluorescenční metody.....	17
1. 2. 1. Luminiscence.....	18
1. 2. 2. Mechanismus fluorescence.....	18
1. 2. 3. Typy fluoroforů.....	21
1. 2. 4. Detekce fluorescence.....	23
1. 2. 5. Fluorescenční značení.....	24
1. 2. 6. Faktory ovlivňující emisi fluorescenčního záření.....	25
1. 3. Funkcionalizace bilirubinův poloze C10.....	27
1. 3. 1. Vazba fluorescenční značky.....	30
2. Experimentální část.....	32
2. 1. Použité materiály, přístroje.....	32
2. 1. 1. Materiály.....	32
2. 1. 2. Přístroje.....	32
2. 2. Seznam použitých chemikálií.....	32
2. 3. Postup práce.....	33
2. 3. 1. Purifikace biliverdinu IX α	33

2. 3. 2. Konjugáty s thiomočovinovou vazbou.....	34
2. 3. 3. Konjugáty s amidickou vazbou.....	35
2. 3. 4. Konjugáty s esterovou vazbou.....	36
2. 3. 5. Ranarubin.....	37
3. Výsledky, diskuse.....	38
3. 1. Purifikace biliverdinu IX α	38
3. 2. Konjugáty s thiomočovinovou vazbou.....	38
3. 2. 1. FITC.....	38
3. 3. Konjugáty s amidickou vazbou.....	41
3. 3. 1. Luminol.....	41
3. 3. 2. 6-karboxyfluorescein.....	42
3. 4. Konjugáty s esterovou vazbou.....	44
3. 4. 1. Dansyl-glycin.....	44
3. 4. 2. 6-karboxyfluorescein.....	46
3. 5. Ranarubin.....	47
4. Závěr.....	51
5. Seznam použité literatury.....	52

Seznam zkratek

BR-DAG	bilirubin-dansyl-glycin
BR-FITC	bilirubin-fluoresceinisothiokyanát
BR-Lumcys	bilirubin-luminol
BR-(N)-CF	bilirubin-N-karboxyfluorescein
BR-(O)-CF	bilirubin-O-karboxyfluorescein
BLVRA	biliverdinreduktasa
DAG	dansyl-glycin
DCC	N,N'-dicyklohexylkarbodiimid
DMAP	dimethylaminopyridin
DMF	N,N'-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOAc	ethylacetát
Et ₃ N	triethylamin
FITC	fluorescein isothiokyanát
FITC-CSA	fluorescein isothiokyanát-cysteamin
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie
HMOX	hemoxygenasa
HOBT	1-hydroxybenzotriazol hydrát
HSA	lidský sérový albumin
IR	infračervené spektrum
Lumcys	luminol-cystein
L-cys-Cl	chlorid L-cysteinu

TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
THF	tetrahydrofuran
UCB	nekonjugovaný bilirubin
UV	ultrafialové spektrum

Cíl diplomové práce

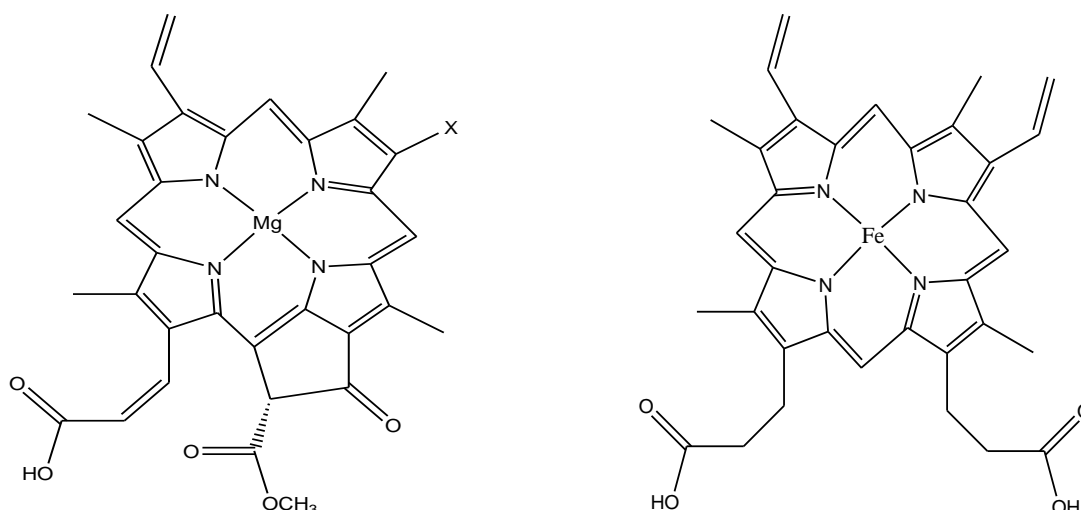
Cílem mojí práce je příprava fluorescenčně značeného bilirubinu ke studiu toxicity tohoto žlučového pigmentu za podmínek *in vitro* i *in vivo*. K této přípravě bude použito vhodné fluorescenční činidlo, které bude pomocí nukleofilní adice navázáno na biliverdin. Tímto postupem vznikne žlučový pigment, který bude označen fluorescenčním barvivem v poloze C10.

1. Teoretická část

1. 1. Žlučové pigmenty

1. 1. 1. Klasifikace

Žlučová barviva biliverdin a bilirubin patří do skupiny tetrapyrolových sloučenin, které jsou v rostlinné i živočišné říši velice hojně zastoupeny. U rostlin se setkáváme s tetrapyrolovou strukturou sloučenin u chlorofylu, sinice a řasy obsahují tzv. biliny (fytochromobilin, fykocyanobilin), které slouží jako světlosběrné pigmenty. Další známou sloučeninou s tetrapyrolovou strukturou je vitamin B₁₂^[1]. Pigmenty biliverdin a bilirubin vznikají rozkladem hemu^[2]. Hem i chlorofyl mají obdobnou strukturu lišící se pouze v drobných detailech (obr. 1)^[1].

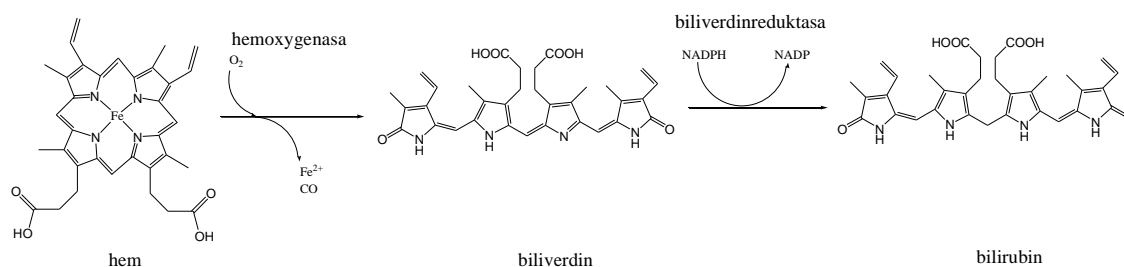


Obr. 1 Srovnání struktury chlorofylu (vlevo) a hemu (vpravo)

1. 1. 2. Katabolismus hemu

Hem je cyklický tetrapyrrol, který má ve svém středu navázaný atom železa. V prvním kroku degradace dochází k oxidaci pomocí hemoxygenasy (HMOX), uvolnění dvojmocného železa a oxidu uhelnatého a vzniku prvního meziproductu – lineárního tetrapyrrolu biliverdinu^[1, 3]. Ve druhém kroku působí enzym biliverdinreduktasa (BLVRA), která redukuje dvojnou vazbu centrálního methinového můstku biliverdinu IX α a tak vzniká konečný produkt katabolické dráhy v systémové

cirkulaci – bilirubin IX α (obr. 2)^[1,3]. BLVRA je ubiquiterní enzym, který bezprostředně a velmi účinně redukuje biliverdin na bilirubin, biliverdin tudíž není detekovatelný v krevním řečišti. Díky tomuto metabolickému kroku nedochází k akumulaci relativně polárního biliverdinu v těle plodu a jeho možným toxickým účinkům. Nepochárný bilirubin prochází placentou prostou difuzí a tímto je tedy zajištěno odbourávání produktů katabolické dráhy hemu z těla plodu^[1].

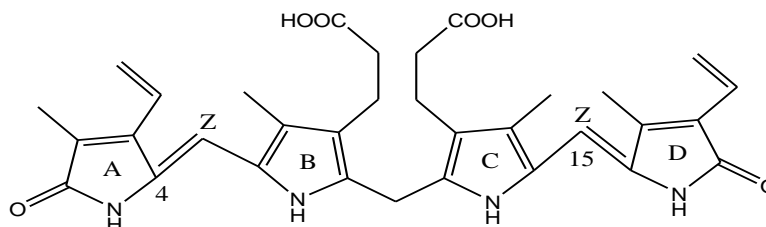


Obr. 2 Degradační dráha hemu

1. 1. 3. Fyzikálně – chemické vlastnosti bilirubinu

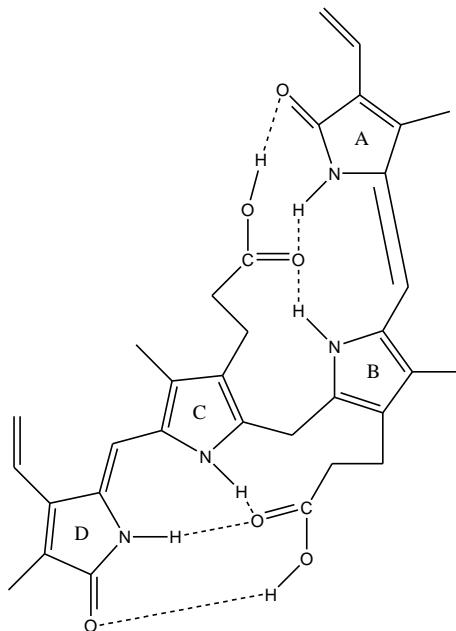
Již v roce 1864 přišel Georg Städelér s hypotézou, že bilirubin vzniká v krevní cirkulaci z hemu. V roce 1916 dokázali van den Bergh s Müllerem, že u člověka existují dvě různé formy bilirubinu. Prvním je nekonjugovaný bilirubin (UCB), který se vyskytuje fyziologicky v krvi, druhý je bisglukuronozyl bilirubin, tedy bilirubin konjugovaný s kyselinou glukuronovou, který je obsažen ve žluči^[1].

UCB je nepolární lineární tetrapyrrolový pigment, který se přirozeně vyskytuje jako 4Z,15Z-bilirubin IX α (obr. 3)^[4]. To značí, že vzniká z izomeru IX porfyrinu, který má stereochemicky uspořádané uhlíky v polohách 4 a 15 v konfiguraci Z.



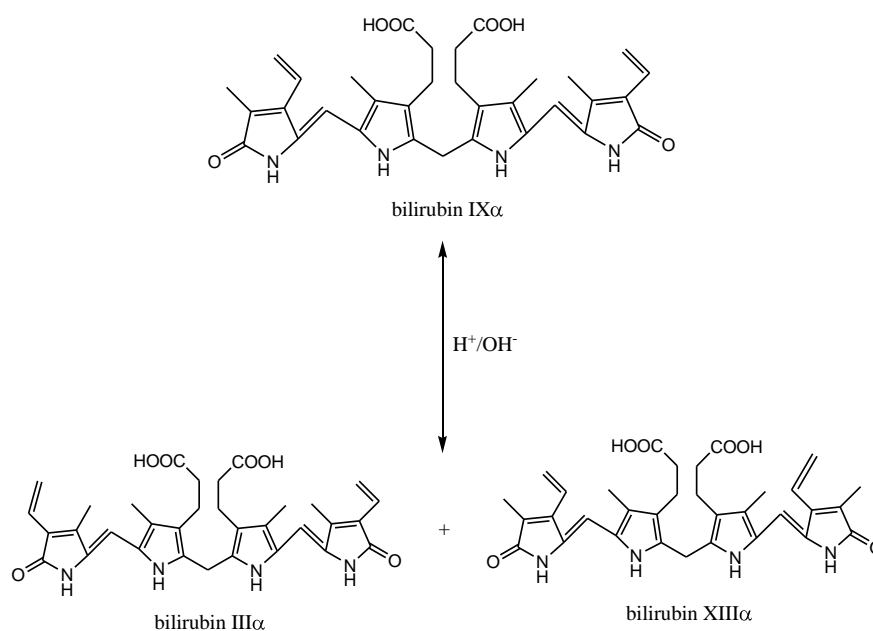
Obr. 3 4Z,15Z-bilirubin IX α

Díky této konfiguraci je umožněn vznik šesti intramolekulových vodíkových vazeb mezi karboxylovými skupinami propionových kyselin na kruzích B a C a polárními skupinami na kruzích A a D (obr. 4)^[5]. Tyto můstky způsobují zablokování polárních skupin a tím její nepolární charakter, a také rigidní strukturu pigmentu^[1].



Obr. 4 Rigidní struktura bilirubinu IX α

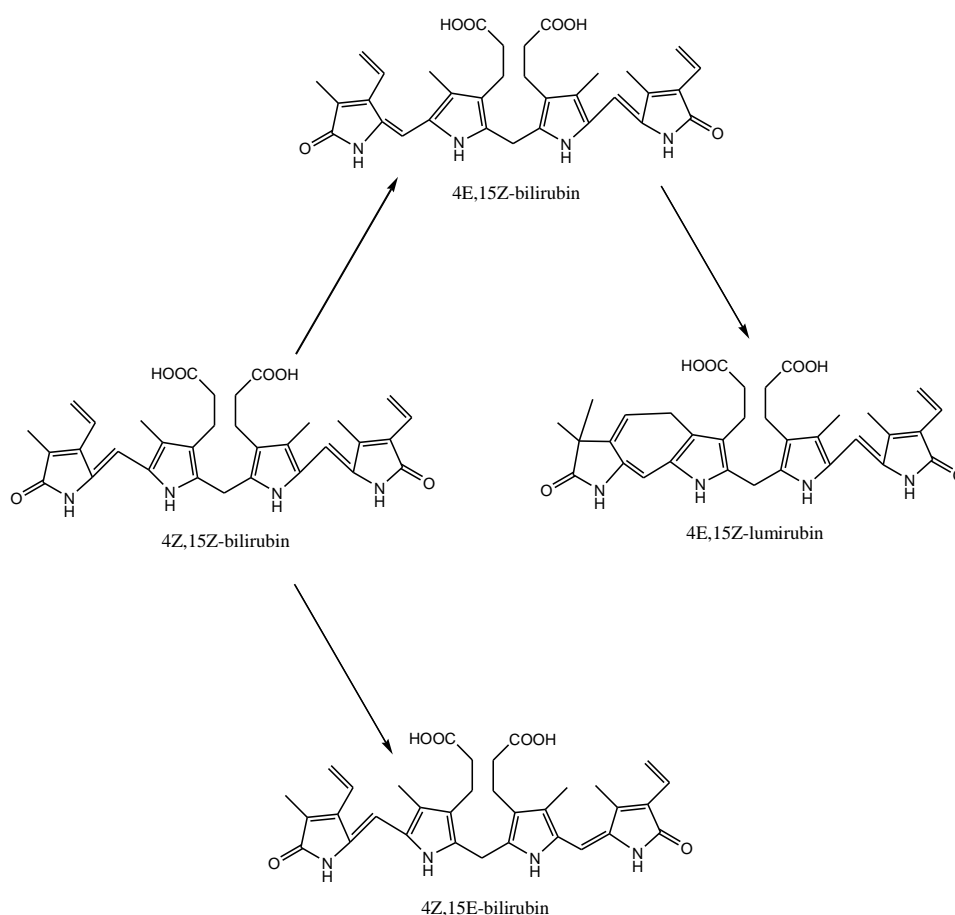
Kvůli tetrapyrolové struktuře se může UCB vyskytovat v určitých typech izomerů. Jeden typ jsou konstituční izomery, které vznikají při rozštěpení molekuly bilirubinu na dvě poloviny a následném náhodném spojení zpět do struktury se čtyřmi pyrolovými jádry^[1]. Takto vzniklé izomery mohou být tři – bilirubin III α , IX α a XIII α (obr. 5)^[6, 7].



Obr. 5 Konstituční izomery bilirubinu III α , IX α a XIII α

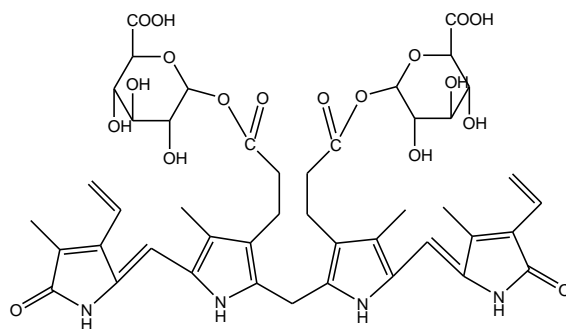
Vznikají kyselou katalytickou reakcí bilirubinu IX α ^[8] a tyto izomery lze od sebe oddělit buď tenkovrstevnou chromatografií^[6, 9], nebo pomocí vysokoúčinné kapalně chromatografie (HPLC)^[10, 11].

Druhým typem izomeru jsou konfigurační izomery ZZ, EE, ZE a EZ, kdy se od sebe liší vazby mezi jádry A a B/C a D (obr. 6). Bilirubin IX α (4Z,15Z) je potenciálně neurotoxický, takže pokud dojde ke zvýšení jeho hladiny v séru, může pomocí difuze projít přes hematoencefalickou bariéru do mozku a způsobit tak nevratné poškození^[12]. Tento přirozený izomer se díky fotochemické reakci mění na izomery ZE/EZ a tím zvyšuje svoji polaritu. Takto vzniklé izomery se vylučují z organismu i bez nutnosti konjugace s kyselinou glukuronovou. Tohoto faktu se využívá při léčbě patologické novorozenecké žloutenky^[4, 13], kdy díky fototerapii se nepolární izomer bilirubinu mění na polárnější a eliminuje se tak z krevního oběhu^[1].



Obr. 6 Konfigurační izomery bilirubinu

Druhou formou bilirubinu je bisglukuronozyl bilirubin, což je bilirubin konjugovaný s kyselinou glukuronovou (obr. 7). Po degradaci hemu dojde k uvolnění UCB do cirkulace. Kvůli své nízké polaritě je nerozpustný ve vodě a musí být navázán na transportní protein albumin, který jej dopraví k jaterní buňce. Poté dochází k disociaci bilirubinu z albuminu a jeho rychlému transportu do cytoplazmy hepatocytu^[1]. Samotná konjugace probíhá za pomoci enzymu bilirubin UDP-glukuronozyltransferasy, kdy dochází k esterifikaci karboxylových skupin na postranních řetězcích^[14] a tím uvolnění dvou vodíkových můstků, čímž se zvýší polarita. Tento konjugát bilirubinu je v lidské žluči zastoupen asi z 80%^[1].

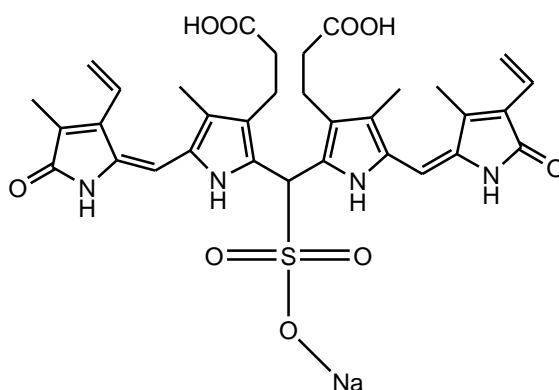


Obr. 7 Bisglukuronozyl bilirubin

1. 1. 4. Ranarubin

Ranarubin, jinak bilirubin-10-sulfonát sodný, je derivát bilirubinu, který se vyskytuje ve žluči obojživelníků – suchozemských skokanů (rod *Rana*). Tento analog má na uhlíku C10 navázanou skupinu $-\text{SO}_3\text{Na}$, která zvyšuje jeho polaritu oproti bilirubinu (obr. 8). Je proto rozpustný v polárních rozpouštědlech jako H_2O , MeOH . Stejně jako u žlučových pigmentů bilirubinu a biliverdinu zde musíme dodržovat určité podmínky, aby nedocházelo k rozpadu tohoto barviva – atmosféra argonu, tma. Bod tání nelze určit, degradace nastává při 150°C .

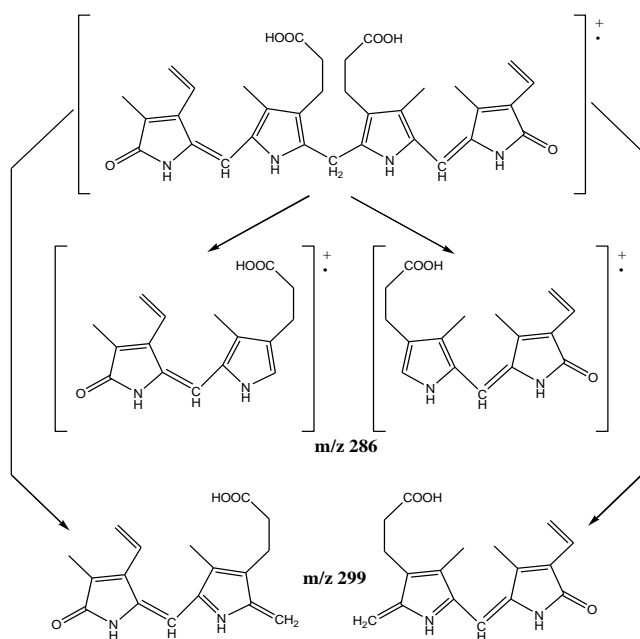
In vitro lze tento pigment připravit adicí hydrogensířičitanu sodného/draselného^[15] na biliverdin. Ranarubin je důležitý pro jeho podobnost s plánovaným fluorescenčně značeným bilirubinem, kdy v obou případech je na atomu C10 navázan atom síry.



Obr. 8 Ranarubin

1. 1. 5. Hmotnostní spektrometrie bilirubinu

Pro verifikaci čistoty látek nebo objasnění chemické struktury produktů se velice často používá metoda hmotnostní spektrometrie, kdy je daná látka ionizována a je měřena hmotnost vzniklé nabitě molekuly nebo fragmentů molekuly vzhledem k náboji. U bilirubinu lze očekávat četné fragmentace, díky jeho struktuře. Základní pík je docela intenzivní (m/z 584), ovšem dva hlavní píky ve spektru vyplývají z rozštěpení molekuly v nejslabším místě – centrální methylenové vazby (obr. 9). Většina z minoritních píků pochází z rozštěpení postranních řetězců na těchto dvou hlavních fragmentech^[16].



Obr. 9 MS: fragmentace bilirubinu

1. 2. Fluorescenční metody

Metody využívající fluorescenční značení se velice hojně používají v biochemickém výzkumu^[17], klinické chemii pro jejich senzitivitu a selektivitu^[18-20]. Tímto způsobem lze monitorovat dělení buněk, zobrazovat určité části buňky^[21], studovat buněčné pochody. Tyto metody elegantně nahrazují značení pomocí radionuklidových zářičů^[22, 23].

1. 2. 1. Luminiscence

Luminiscence je jev, kdy je z látky emitováno světlo, díky excitovanému stavu elektronů. Podle délky trvání vyzařovaného světla můžeme luminiscenci rozdělit na:

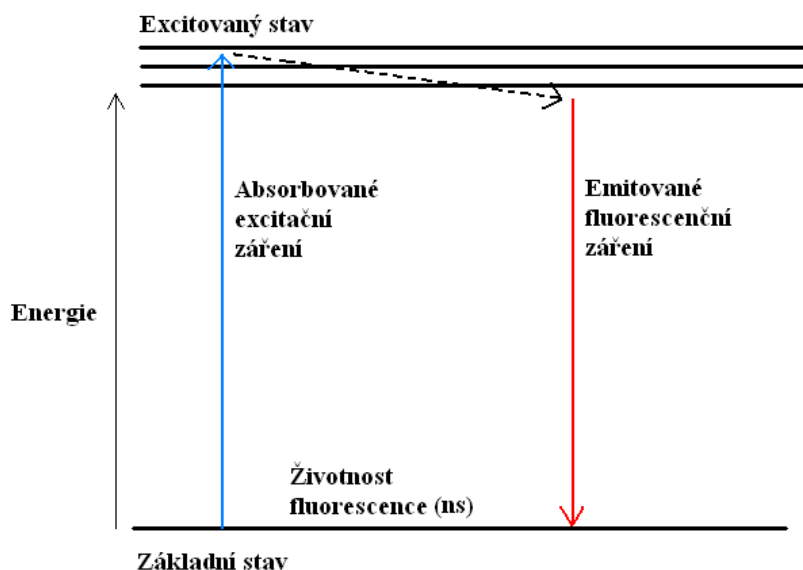
- fluorescenci – pozorujeme v průběhu excitace, po skončení buzení emise světla vymizí
- fosforescenci – tento jev má delší dobu dohasínání než fluorescence
- zpožděnou fluorescenci – stejný princip jako u fluorescence jen s tím rozdílem, že doba dohasínání je zde prodloužena o čas, který molekula stráví v metastabilním tripletovém stavu

1. 2. 2. Mechanismus fluorescence

Fluorescenční molekuly, resp. fluorofory, reagují na světlo odlišným způsobem než ostatní molekuly. Foton excitačního světla je absorbován elektronem fluorescenčně aktivní skupiny, čímž zvýší svoji energii do excitovaného stavu. Během tohoto budivého okamžiku se část energie rozptýlí v molekule a zbytek je vyzářen jako foton a molekula se navrácí zpět do svého základního stavu. Energie emitovaného fotonu je menší než energie excitačního, proto bude vlnová délka emisního záření větší než vlnová délka excitačního světla – Stokesův zákon^[22, 24]. Mechanismus se dá shrnout do tří základních kroků:

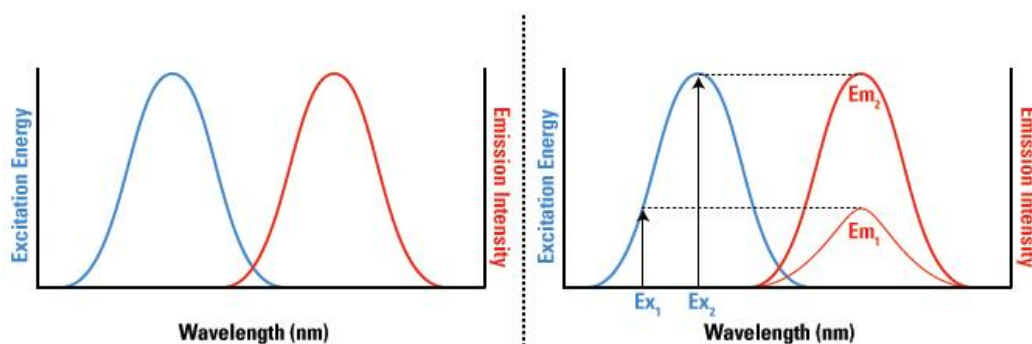
- excitace
- doba excitovaného stavu
- emise fluorescence

Tato tři stádia popisuje Jablonskiho diagram (obr. 10)^[25]:



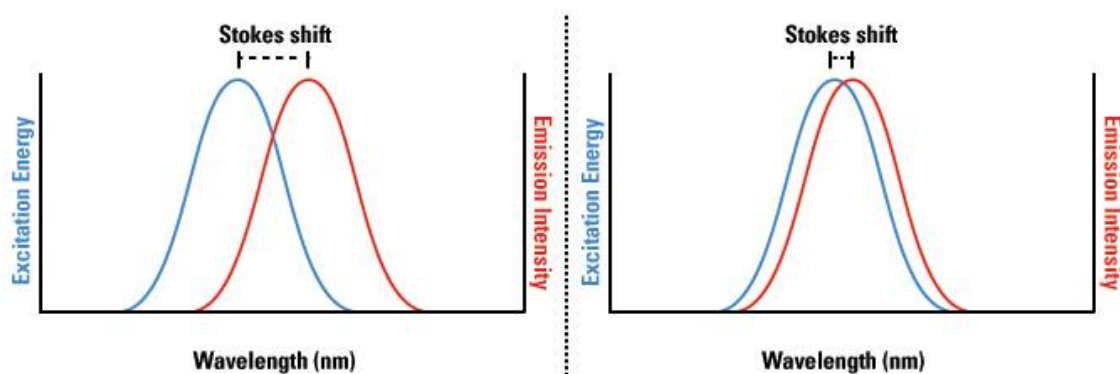
Obr. 10 Jablonskiho diagram – vznik emisního fluorescenčního záření

Vlnová délka excitačního i emitovaného světla je specifická pro každý fluorofor. Tyto vlnové délky mohou být diskrétní u monoatomického fluoroforu, ale u víceatomového fluoroforu vykazují široká excitační a emisní spektra (obr. 11)^[24]. V emisním spektru závisí intenzita fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitačního záření. To stejné platí i pro excitační spektrum, ovšem při konstantní vlnové délce emitovaného záření^[22]. Na ose x jsou vlnové délky odpovídající maximální a minimální intenzitě signálu excitačního a emitovaného záření fluoroforu. Na ose y jsou odpovídající intenzity záření. Vlnová délka emitovaného záření je nezávislá na vlnové délce excitačního světla, ovšem intenzita emise je úměrná amplitudě vlnové délky excitačního záření.



Obr. 11 Excitační a emisní spektra fluoroforu

Pro velké množství organických látek platí tzv. zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem. To je dáno stejnou relativní pravděpodobností vibračních hladin emise a absorpce. Vzdálenost mezi maximy absorpčního a emisního pásu se nazývá Stokesův posun (obr. 12). Tento posun je charakteristický pro každý fluorofor. Pokud je malý, je velice obtížné rozlišit excitaci a emisi, jelikož se vlnové délky těchto dvou jevů značně překrývají. Stokesův posun je rozhodující, jedná-li se o mnohonásobnou fluorescenci. Vlnová délka při emisi jednoho fluoroforu může překrývat excitaci druhého fluoroforu ve vzorku^[24].



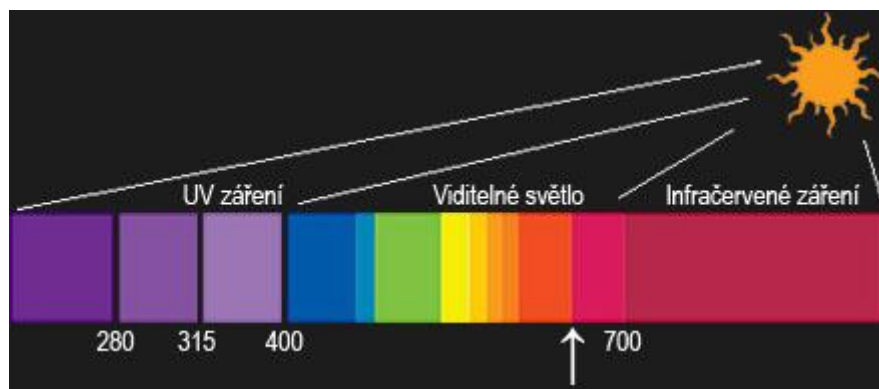
Obr. 12 Stokesův posun

Mezi hlavní charakteristiky fluorescence patří:

- intenzita
- polarizace
- koherenční vlastnosti
- doba dohasínání
- spektrální složení

Elektromagnetické spektrum je široké spektrum všech vlnových délek elektromagnetického záření, viditelné světelné spektrum je ale omezeno jen na velmi malý rozsah vlnových délek. Z počátku byl výzkum zabývající se fluorescenčními aplikacemi omezen pouze na fluorofory, které měly vlnovou délku emitujícího záření v rozmezí viditelného spektra (390 – 700 nm), protože nebyla možnost detekce i

v jiných oblastech spektra. Díky technologickému pokroku nyní můžeme detegovat i fluorofory za hranicemi viditelné oblasti spektra – v ultrafialové (UV) a infračervené (IR) (obr. 13). Tyto novinky přináší větší variabilitu, universálnost a multiplexní možnosti ve vývoji nových aplikací^[24].



Obr. 13 Spektrální složení

Pokud hovoříme o vlnových délkách emitovaného fluorescenčního světla, je také nutné zmínit další fyzikální vlastnost, jas. Jas daného fluoroforu je určen molárním extinkčním koeficientem a kvantovým výtěžkem, který je specifický pro každou fluorescenční barvu. Molární extinkční koeficient je definován jako množství světla, které by mohlo být absorbováno fluoroforem při dané vlnové délce a je měřena v $M^{-1} cm^{-1}$. Kvantový výtěžek Φ se spočítá jako počet fotonů, které jsou emitovány fluoroforem děleno počtem fotonů, které jsou absorbovány. Tento výsledek nám určuje účinnost fluoroforu a jeho maximum může dosáhnout 1. Jas fluoroforu je vypočítán součinem ϵ a Φ .

1. 2. 3. Typy fluoroforů

Fluorescence se v biologickém výzkumu používá už skoro 100 let, vývoj ve fluorescenční chemii zároveň s technickými objevy podnítil rozvoj mnoha nových fluoroforů. Obrovský výběr fluoroforů dnes poskytuje větší flexibilitu, variace a výkon pro výzkumné aplikace než kdy dřív. Fluorofory lze rozdělit do tří obecných skupin:

- organická barviva

- biologické fluorofory
- quantum dots (kvantové tečky)

Každý fluorofor má odlišné vlastnosti, které by měly být uváženy při rozhodování, který fluorofor použít pro kterou aplikaci nebo experimentální systém.

Organická barviva - syntetická organická barviva, jako je fluorescein, byly první fluorescenční sloučeniny používané v biologickém výzkumu. Deriváty těchto původních sloučenin byly vyrobeny s cílem zlepšit jejich fotostabilitu a rozpustnost. Tyto sloučeniny jsou také derivatizovány kvůli použití v biokonjugaci, zejména fluorescein isothiokyanát (FITC)^[26], rhodamin (tetramethylrhodamin isothiokyanát, TRITC), a další komerční varianty se širokým uplatněním. Malá velikost těchto sloučenin je výhodou oproti biologickým fluoroforům při biokonjugacích, protože mohou být sít'ovány do makromolekul, jako jsou protilátky, biotin nebo avidin, aniž by zasahovaly do řádné biologické funkce. Široká škála sloučenin s charakteristickými excitačními/emisními spektry, optimálními kvantovými výtěžky a extinkční koeficienty jsou komerčně dostupné pro všechny fluorescenční aplikace.

Biologické fluorofory - zatímco bioluminiscence byla známá po tisíciletí, k prvnímu použití biologického fluoroforu pro výzkumné aplikace došlo až v roce 1990, kdy byl naklonován z medúzy *Aequorea victoria* zelený fluorescenční protein (GFP) a používal se jako reportér genové exprese. Od té doby deriváty původního GFP, fykobiliproteiny (allofykocyanin, fykocyanin, fykoerytrin a fykoerythrocyanin) a mnoho dalších proteinů byly navrženy pro použití v biologických expresních systémech, a jejich použití je dnes běžné v biologickém výzkumu.

Přínos těchto typů fluoroforů je, že pomocí plasmidů mohou být zavedeny do bakterie, buňky, orgánu nebo celého organismu a tam studovány fluorofory buď samostatně, nebo v rámci biologických procesů. Použití fluorescenčních proteinů může být časově náročné a produkce velkého množství fotonů může způsobit tvorbu reaktivních forem kyslíku a vyvolat tak nežádoucí účinky nebo toxicitu. Navíc může velikost fluorescenčního proteinu měnit normální biologickou funkci buněčné bílkoviny, na kterou je fluorofor navázán, k tomu obvykle biologické fluorofory nemají tak vysokou úroveň fotostability a citlivosti jako syntetická fluorescenční barviva.

Quantum dots - kvantové tečky jsou nanokrystaly s jedinečnými chemickými vlastnostmi, které poskytují pevnou kontrolu nad spektrálními charakteristikami fluoroforu. Kvantové tečky byly vyvinuty v roce 1980 a od roku 1990 se stále více používají ve fluorescenčních aplikacích v biologickém výzkumu. Kvantové tečky jsou díky své velikosti (2-50nm) polovodiče, které po excitaci emitují fluorescenční záření vlnové délky podle velikosti částic. Menší kvantové tečky vyzařují vyšší energii než velké kvantové tečky, a proto se vyzařované světlo přesouvá z modré na červenou jak se velikost nanokrystalů zvyšuje. A protože velikost kvantové tečky může být přísně kontrolována, je zde větší přesnost excitačních a emisních vlnových délek než u ostatních fluoroforů.

Bylo publikováno, že kvantové tečky jsou mnohem více fotostabilní než ostatní fluorofory. Jedna zpráva dokonce ukázala, že kvantové tečky zůstaly zářit po dobu 4 měsíců v *in vivo* zobrazovací studii^[27]. Kromě toho mohou být kvantové tečky použity v různých biologických aplikacích, jako je značení bílkovin. Zatímco se využití kvantových teček v biologických aplikacích zvyšuje, jsou zmiňovány zprávy o buněčné toxicitě^[28] a i jejich použití může být cenově dost náročné.

1. 2. 4. Detekce fluorescence

Bylo vyvinuto mnoho různých typů detekčních přístrojů, přičemž každý je specifický pro odlišné experimentální hodnoty. Všechny fluorescenční systémy mají ale čtyři společné základní požadavky:

- zdroj excitačního záření – laser, fotodioda, lampa (xenonová oblouková a rtuťová)
- fluorofor
- filtry k izolaci určité vlnové délky k excitaci různých fluoroforů
- detektor zaznamenávající elektronický signál jako výstupní hodnotu

Ačkoliv tento seznam není úplný a vyčerpávající, stále se vyvíjí nové a lepší vybavení, všechny základní požadavky splňují tyto přístroje^[29]:

- fluorescenční mikroskopy – zjišťují umístění fluoroforu (nejčastěji FITC)^[30] jak ve 2D tak ve 3D
- fluorescenční skenery – zjišťují lokalizaci fluoroforu ve 2D
- spektrofluorometry – zaznamenávají průměrnou fluorescenci ve vzorku
- průtokové cytometry – analyzují fluorescenci jednotlivých buněk ve vzorku populace

1. 2. 5. Fluorescenční značení

Fluorescenční značení je proces kdy se fluorofor kovalentně váže na jiné molekuly, například bílkoviny nebo nukleové kyseliny. Toto se obecně provádí pomocí reaktivního derivátu fluoroforu, který se selektivně váže na funkční skupiny přítomné v cílové molekule. Nejčastěji označené molekuly jsou protilátky, které jsou následně použity jako specifické sondy k detekci určitého cíle. Fluorescenční značení lze použít pro celou řadu detekčních systémů a umožňuje citlivé a kvantitativní měření.

Pro značení molekul jsou potřeba chemicky reaktivní deriváty fluoroforů. Mezi reaktivní skupiny patří amin-reaktivní^[31] isothiokyanátové deriváty, včetně FITC, amin-reaktivní sukcinimid estery, jako je NHS-fluorescein nebo NHS-rhodamin, a sulfhydryl-reaktivní^[32, 33] maleinimidové aktivované fluorofory jako fluorescein-5-maleinimid. Reakce těchto reaktivních barviv s jinou molekulou dávají vznik stabilní kovalentní vazbě mezi fluoroforem a značenou molekulou. Isothiokyanáty se již dlouho používají jako reaktivní skupina pro upevnění fluorescenčního barviva na proteiny prostřednictvím primárních aminových skupin lysinu. NHS-ester je nyní preferovaná metoda značení, protože produkuje více stabilní vazby. Reakce využívající sulfhydrylovou- reaktivní skupinu fluoroforu k vazbě na protein se zaměřují na cysteinové zbytky, kde dochází k vazbě fluorescenčního barviva^[34].

Dalším krokem značení je často nutnost odstranit nezreagované fluorescenční barvivo z cílové molekuly. Velice často se to provádí pomocí gelové chromatografie, kde se využívá výhody v rozdílných velikostech fluoroforu a označeného proteinu,

nukleové kyseliny, atd. Bohužel se ale stává, že fluorofory interagují s typickými separačními maticemi, což snižuje jejich recyklovatelnost i vlastní separaci.

1. 2. 6. Faktory ovlivňující emisi fluorescenčního záření

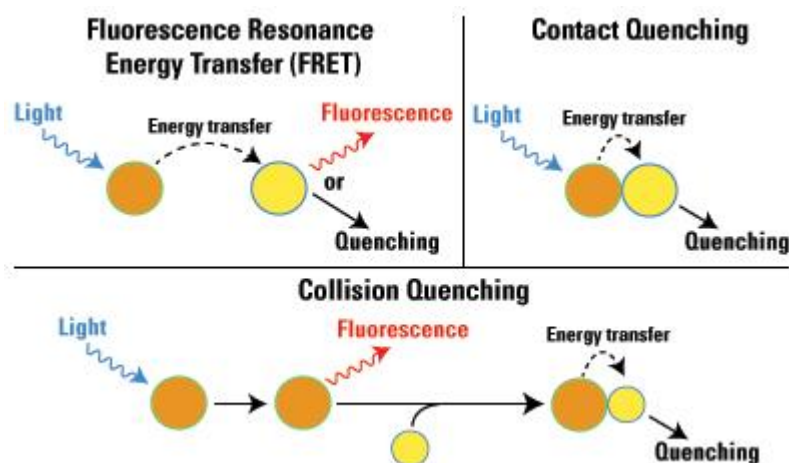
Zhášení - emise fluoroforu může být přímo ovlivněna interakcí s jinými fluorescenčními nebo non-fluorescenčními molekulami, které mohou "uhasit" vznikající záření z vybuzeného fluoroforu. Zhášení fluorescence se často používá k určení aktivního stavu proteinů nebo identifikaci genové exprese, protože zhášedlo může být navrženo tak, aby se přidávalo nebo odstraňovalo v závislosti na daných biologických pochodech.

Rozsah zhášení závisí na povaze tlumící molekuly (fluorofor nebo non-fluorofor), typu interakce a energii, která je emitována fluoroforem. Metody fluorescenčního zhášení jsou: fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET), kolizní zhášení a kontaktní zhášení (obr. 14).

FRET – excitační záření vyvolá u fluoroforu excitovaný stav, který vyústí v uvolnění fotonu. Molekula akceptoru, což může být další fluorofor nebo non-fluorofor, je navržena tak, aby byla co nejbližší donoru fotonu a mohla jej snadno absorbovat. Tak dojde k efektivnímu zhášení emitovaného světla.

Kolizní zhášení – vzniká tehdy, když excitovaný fluorofor reaguje s molekulou zhášedla v roztoku, což způsobí okamžitý přenos energie na tuto molekulu a vybuzený fluorofor relaxuje.

Kontaktní zhášení – fluorofor je v komplexu s molekulou zhášedla ještě před excitací. Jakmile dojde k vybuzení fluoroforu, okamžitě přejde excitační energie na kontaktní molekulu a tato energie se ztratí v podobě tepla.



Obr. 14 Způsoby zhášení fluorescence

Background fluorescence - detekce fluoroforu v daném experimentu může být zakryta vysokým pozadím fluorescence, která je nejčastěji způsobena nedostatečným odstraněním nenávané fluorescenční značky nebo autofluorescencí vzorku. Pečlivé čištění nebo snížení koncentrace fluorescenční sondy může snížit pozadí fluorescence. Při autofluorescenci ovšem dochází k endogenní fluorescenci složek ve vzorku. Autofluorescence se v biologických vzorcích nejčastěji vyskytuje při použití kratší vlnové délky excitačního světla (obvykle <500nm). Proto může být autofluorescence minimalizována nebo eliminována buď pomocí fluoroforů, které nejsou buzeny ve stejném spektru jako vzorek nebo sady filtrů, které specificky ozáří úzkou vlnovou délkou pouze cílový fluorofor.

Nízká fluorescence - Nízká intenzita fluorescence může omezit detekci cílového fluoroforu, zejména je-li pozadí fluorescence vysoké. Intenzita fluorescence může být rozšířena zvýšením počtu fluoreskujících molekul v cílovém místě. To může být provedeno buď pomocí vyšší koncentrace sondy v experimentu nebo zvýšením transportu fluoroforu do cílového místa. Oba přístupy mohou ale negativně ovlivnit detekci signálu, protože zvýšená koncentrace sondy může způsobit buněčné narušení (zejména intracelulárních sond) nebo samozhášení (z důvodu vysoké úrovně mezimolekulárních interakcí) či indukovat buněčnou smrt.

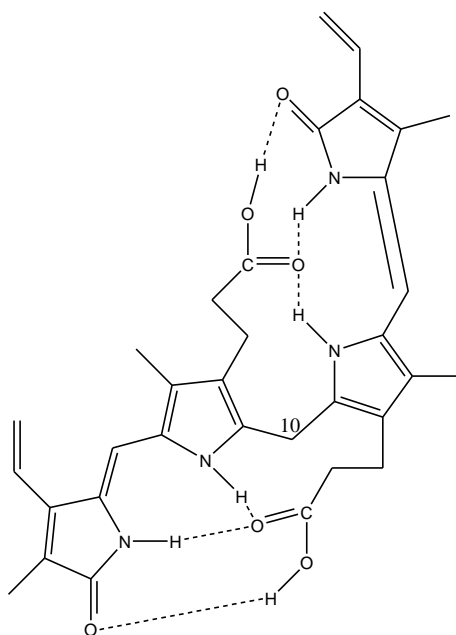
Kromě hromadění počtu fluorescenčních sond v systému, se někdy může nízká intenzita

fluorescence zvýšit tím, že se zvýší budící intenzita světla, protože intenzita excitace je přímo úměrná excitační energii. Použití tohoto přístupu musí být v rovnováze, aby se předešlo fotovybělování.

Fotovybělování (photobleaching) - fotovybělování je nevratné zničení fluoroforu v souvislosti s prodlouženou expozicí budícího zdroje nebo vystavení vysoké intenzitě excitačního světla. Fotovybělování lze minimalizovat nebo zabránit tím, že fluorofory vystavíme nejnižší možné úrovni intenzity budícího světla po nejkratší možnou dobu, která ale stále zajišťuje nejlepší detekci signálu. To vyžaduje optimalizaci metody, detekci pomocí CCD kamery s vysokou citlivostí a vysokou numerickou aperturou objektivu. Další přístupy zahrnují použití fluoroforů, které jsou více fotostabilní než tradiční fluorofory a/nebo pomocí protivybělovacího činidla na ochranu fluoroforu proti fotovybělování. Opatření k zamezení photobleaching nejsou proveditelná pro všechny detekční metody a měly by být optimalizovány pro každou použitou metodu.

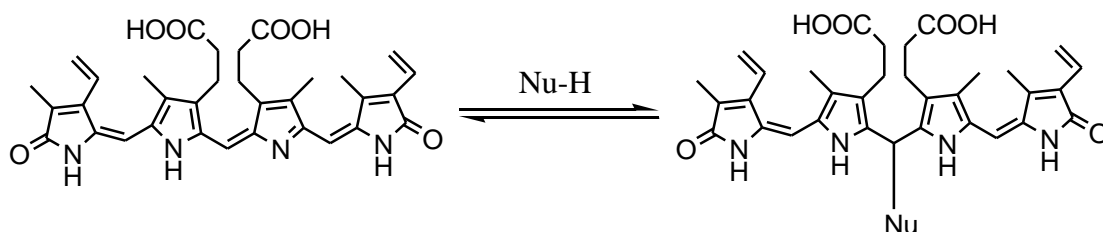
1. 3. Funkcionalizace bilirubinu v poloze C10

Poloha C10 je ideální místo pro navázání fluorescenční značky, aby nedošlo k porušení konformace otevřené knihy s šesti vodíkovými můstky (obr. 15).



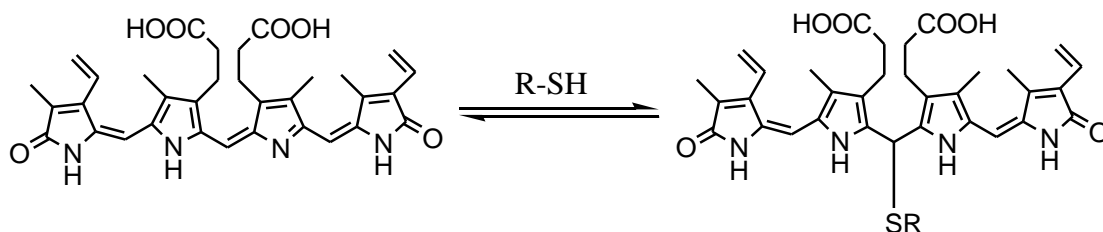
Obr. 15 Bilirubin IXa – poloha C10

První možností je nukleofilní adice na konjugovaný systém biliverdinu (obr. 16). Tento typ reakce byl studován Falkem a spol., kteří na biliverdin adovali thiooly, aminy a C-kyseliny^[35]. Produkty ovšem neizolovali, pouze je spektroskopicky studovali. Tento typ reakce je reverzibilní, rovnováha je obvykle posunuta ve prospěch výchozích látek. Proto je třeba pracovat s velkým nadbytkem nukleofilního činidla.



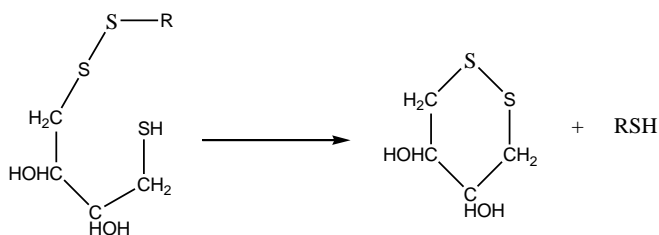
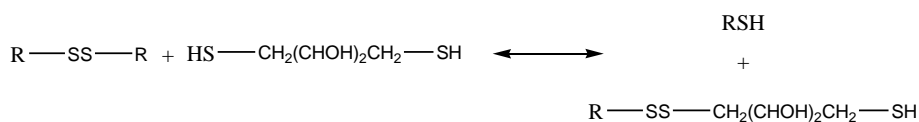
Obr. 16 Nukleofilní adice na biliverdin

Na biliverdin byly adovány mnohé thiooly – thiooctová kyselina, cystein, glutation, merkaptooctová kyselina, merkaproethanol. Některé z produktů byly izolovány a charakterizovány. Pro dobrý výtěžek reakce je opět nutno použít velký nadbytek nukleofilního činidla (obr. 17)^[36].



Obr. 17 Nukleofilní adice merkapto skupiny

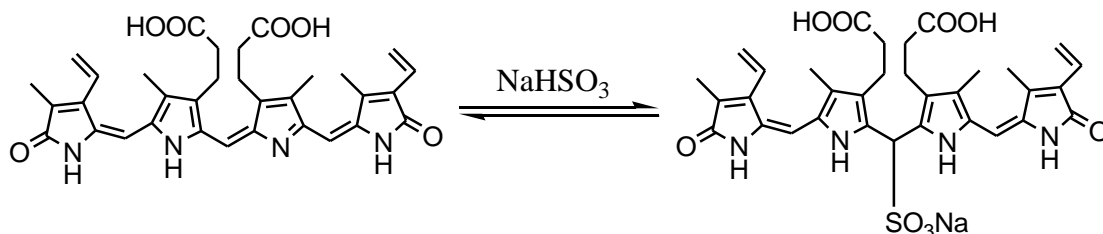
Thiooly jsou známé díky jejich přeměnám na disulfidy oxidací vzdušným kyslíkem^[37]. Aby se udržel redukovaný stav látek, přidává se další thiol (cystein, glutation, merkaproethanol,..), díky kterému dochází k přeměnám pouze z disulfidů na thiooly a naopak (obr. 18)^[37, 38]. Tyto děje probíhají v buňce neustále díky velkému zastoupení cysteinu a jeho disulfidu cystinu^[39].



Obr. 18 Redukce disulfidu dithiothreitem (DTT)

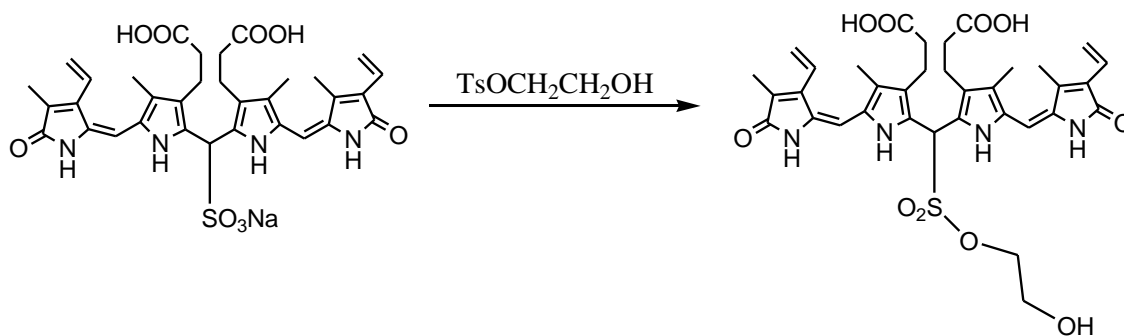
Nejpoužívanější redukční činidla disulfidů jsou samy thioly. Nejčastěji se jedná o merkaptoethanol nebo dithiothreitol (DTT). DTT není příliš stabilní při dlouhodobém skladování, pokud není v přítomnosti kovových chelátů. Z tohoto důvodu je v současné době nahrazován novým redukčním činidlem tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP)^[24].

Další možností je adice hydrogensířičitanu sodného nebo draselného ($NaHSO_3/KHSO_3$) za vzniku bilirubin-10-sulfonátu sodného/draselného – tzv. ranarubinu (obr. 19)^[26].



Obr. 19 Vznik ranarubinu

V dalším kroku by byla sulfonová skupina ponechána reagovat s 2-tosyloxyethanolem za vzniku derivátu s koncovou OH skupinou (obr. 20), což by vedlo k vytvoření vhodného prekursoru pro fluorescenční značení.

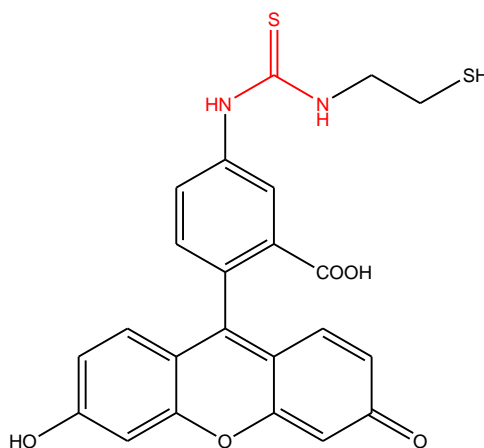


Obr. 20 Vznik prekurzoru k fluorescenčnímu značení

1. 3. 1. Vazba fluorescenční značky

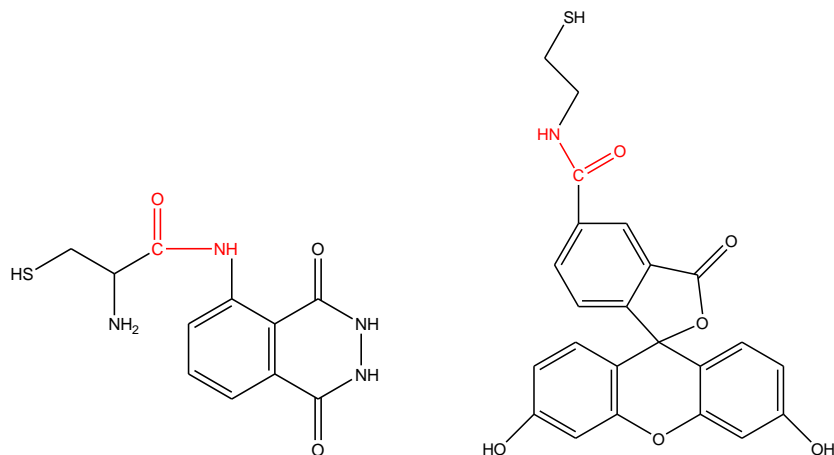
Aby bylo možné navázat fluorescenční barvivo na biliverdin, musí se nejprve vhodně modifikovat. Krátký alifatický řetězec, který spojuje žlučový pigment s fluorescenční značkou, musí být na jedné straně opatřen reaktivní skupinou, vhodnou k vytvoření kovalentní vazby s fluoroforem a na druhé straně mít sulfhydrylovou skupinu, díky které dojde k nukleofilní adici na biliverdin.

- a. **Thiomočovinová vazba** – vazba se tvoří mezi amino skupinou alifatické spojky a thiokvano skupinou fluorescein isothiokyanátu (obr. 21).



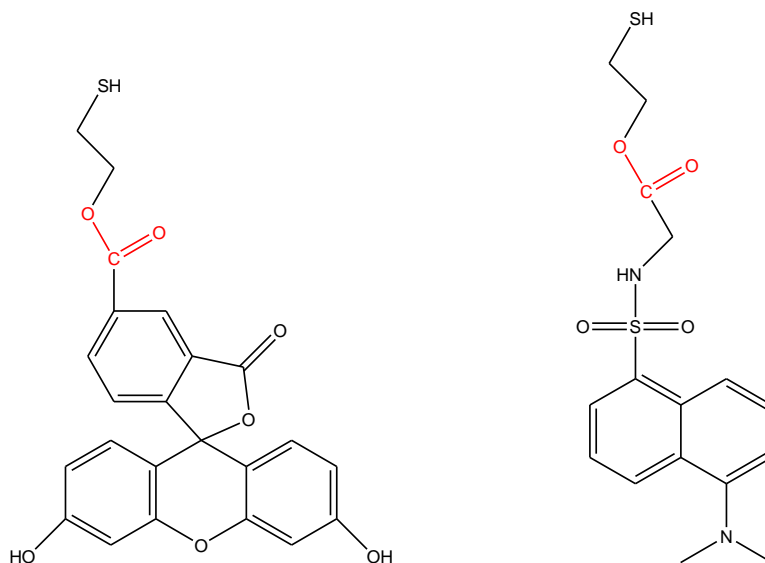
Obr. 21 Thiomočovinová vazba (fluorescein isothiokyanát)

- b. **Amidická vazba** – tvorba peptidové vazby nastává mezi amino skupinou a karboxy skupinou za odštěpení molekuly vody (obr. 22).



Obr. 22 Amidická vazba (luminol – vlevo; karboxyfluorescein – vpravo)

- c. **Esterová vazba** – vznik esteru reakcí alkoholu s karboxylovou kyselinou za odštěpení vody (obr. 23).



Obr. 23 Esterová vazba (karboxyfluorescein – vlevo; dansyl-glycin – vpravo)

2. Experimentální část

2. 1. Použité materiály, přístroje

2. 1. 1. Materiály

- TLC desky Silikagel F_{60/254}
- TLC desky RP 18
- 97,5% Argon (Linde)

2. 1. 2. Přístroje

- hmotnostní spektrometr Bruker Daltonics Esquire 3000 (ESI)
- NMR spektrometr Varian Unity 400 Inova
- UV lampa ($\lambda = 254\text{nm}$)
- analytické váhy Scaltec
- ultrazvuková lázeň Sonorex Super
- vodní termostat MLW typ U4
- Schoeller Hettich Zentrifugen EBA 21
- Labnet Spectrafuge 16M

2. 2. Seznam použitých chemikálií

Biliverdin – Frontier Scientific, cysteamin hydrochlorid – 98% (Sigma-Aldrich, Německo), dansyl-glycin – (Sigma-Aldrich, Německo), diethylether – bezvodý, dichlormethan – p.a. (Merck), dimethylaminopyridin – 98% (Sigma-Aldrich, Německo), dimethylsulfoxid – čistý, 99% (Sigma-Aldrich, Německo), N,N'- dimethylformamid – čistý, 99,5% (Fluka, Německo), dithiothreitol – 99% (Sigma-Aldrich, Německo), ethylacetát – p.a. (Merck), fluorescein isothiokyanát – isomer I, 90% (Sigma-Aldrich, Německo), hydrogenuhličitan sodný – bezvodý, p.a.

(Lachema, Brno), hydroxid sodný – čistý (Penta, Chrudim), 3-chlor-propan-1-thiol – čistý, 98% (Sigma-Aldrich, Německo), chloroform – bezvodý, 99,8% (Fluka, Německo), 5,6-karboxyfluorescein – čistý, 95% (Sigma-Aldrich, Německo), L-cystein hydrochlorid – (Sigma-Aldrich, Německo), luminol – 97% (Sigma-Aldrich, Německo), 2-merkaproethanol – čistý, p.a. (Fluka, Německo), methanol – pro HPLC, pyrosiřičitan sodný – (Lachema, Brno), síran hořečnatý – bezvodý, čistý (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice), síran sodný – bezvodý, čistý (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice), tetrahydrofuran – bezvodý, 99,9% (Sigma-Aldrich, Německo), thionylchlorid – 99% (Sigma-Aldrich, Německo), triethylamin – 99% (Sigma-Aldrich, Německo), N,N'- dicyklohexylkarbodiimid – 99% (Sigma-Aldrich, Německo), 1-hydroxybenzotriazol hydrát – 97% (Sigma-Aldrich, Německo).

2. 3. Postup práce

2. 3. 1. Purifikace biliverdinu IX α

Silikagel (15 g) ve směsi methanol/aceton (1 : 1; 45 ml) byl nalit do chromatografické kolony opatřené fritou. Gravitací se nechal silikagel usadit a poté byla hladina rozpouštědla snížena lehce nad okraj vzniklé kolonky. Pak se nechalo kolonkou protéct dalších cca 20 ml mobilní fáze (methanol/aceton; 1 : 1). Pomocí Pasteurovy pipety byl opatrně a rovnoměrně nanesen na kolonu roztok obsahující surový biliverdin (100 mg) v rozpouštědle methanol/aceton (1 : 1; 30 ml). V prvním kroku byla kolona promyta 10 ml směsí methanol/aceton, poté následovalo promytí směsí chloroform/methanol/kyselina octová (7 : 3 : 0.03). Postupně se vymývaly látky žlutozelené a zelené barvy, sbírány byly pouze finální modro-zelené frakce. Ty byly spojeny a odpařeny za vakua do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 0,1M NaOH a následně přefiltrován. K této směsi filtrátů byly přidány 3 kapky ledové kyseliny octové a vzniklá sraženina byla separována centrifugací. Precipitát byl třikrát promyt stejným objemem vody a takto promytá látka byla rozpuštěna ve směsi aceton/voda (8 : 2; 40 ml). Pak bylo přidáno dalších 40 ml vody a po promíchání bylo přidáno 5 μ l kyseliny octové a znovu promícháno. Po deseti minutách byla směs centrifugována a oddělená pevná fáze promyta vodou. Výsledná pevná látka byla uchována v mrazicím boxu^[9].

Výtěžek přečištění komerčního biliverdinu je okolo 50%.

2. 3. 2. Konjugáty s thiomocovinovou vazbou

- **Fluorescein isothiokyanát**

- a. Příprava fluorescein – disulfidu*

Bylo naváženo 85,3 mg cysteamin hydrochloridu, který byl rozpuštěn v 1 ml 1M NaHCO₃. Dále bylo naváženo 7,6 mg FITC, který byl rozpuštěn v 0,1 ml odplyněného DMSO, pak bylo přidáno 20 µl 0,75M cysteaminu. Vznikl čirý červený roztok, ze kterého po přidání THF a odstředění (10 min, 13 000 RPM) byla izolována sraženina. Supernatant byl odsát a sraženina promyta THF. Surový produkt byl analyzován hmotnostní spektrometrií.

- b. Redukce disulfidu*

Promytý precipitát z reakce *a.* byl rozpuštěn v MeOH a byl k němu přidán dithiothreitol (1,15 mg, 1 ekv.) jako redukční činidlo. Reakce probíhala 1 hodinu. Produktem redukce byl FITC-CSA, jeho identita byla ověřena hmotnostní spektrometrií (ESI-MS: $m/z = 465$) a látka byla bez dalšího čištění použita do další reakce.

- c. Adice na biliverdin*

Bylo naváženo 0,5 mg (1 µmol) biliverdinu, který byl následně rozpuštěn v odplyněném MeOH, bylo přidáno 10 µl triethylaminu a do baňky zaveden argon. Poté byl do reakční směsi přidán FITC-CSA a za laboratorní teploty byla směs ponechána reagovat přes noc. Výsledným produktem byl BR-FITC, který byl analyzován hmotnostní spektrometrií (ESI-MS: $m/z = 1047,0$), ale izolace z reakční směsi provedena nebyla.

2. 3. 3. Konjugáty s amidickou vazbou

- **Luminol**

- a. Chlorid L-cystein hydrochloridu (L-cys-Cl)*

L-cystein · HCl (15,7 mg) byl rozpuštěn ve 20 ml dichlormethanu a bylo přidáno 22 μ l SOCl₂. Tato reakční směs byla vložena do ultrazvukové lázně na 30 minut a bez dalšího čištění byl produkt použit v dalším kroku.

- b1. Reakce luminolu s L-cys-Cl (Lumcys)*

Luminol (20 mg, 0,113 mmol) byl rozpuštěn v 1 ml CH₂Cl₂, byl přidán triethylamin (15 μ l, 0,100 mmol) a po kapkách L-cys-Cl (0,226 mmol). Reakční směs byla pod atmosférou argonu a míchána dokud se z bílé disperze nestala nažloutlá kapalina (1 – 2 hodiny)^[27]. Po dokončení reakce bylo ke směsi přidáno 10 ml vody. Vzniklá suspenze byla přefiltrována a extrahována do AcOEt. Extrakt byl vysušen síranem hořečnatým a následně odpařen za vakua. Výsledný odparek byl nažloutlé barvy (5,8 mg, 29%). Ověření vzniklého meziproductu bylo provedeno hmotnostní spektrometrií (ESI-MS, $m/z = 283,0$).

- b2. Reakce luminolu s 3-chlor-propan-1-thiolem*

Luminol (20 mg, 0,113 mmol) byl rozpuštěn v 1 ml CH₂Cl₂, do vzniklého roztoku byl přidán triethylamin (15 μ l, 0,100 mmol) a poté pomalu 3-chlor-propan-1-thiol (16,5 μ l, 0,170 mmol). Celá reakční směs byla pod atmosférou argonu a míchána dokud se z bílé disperze nestala nažloutlá kapalina (1 – 2 hodiny).

- c. Adice Lumcys na biliverdin*

Biliverdin (0,5 mg, 0,001 mmol) byl rozpuštěn v 1 ml THF, k roztoku byl přidán Et₃N (10 μ l, 0,067 mmol) a Lumcys (5,8 mg, 0,022 mmol) vyrobený v kroku *b1*. Za

laboratorní teploty byla směs míchána přes noc. Výsledný produkt BR-Lumcys byl analyzován hmotnostní spektrometrií (ESI-MS: $m/z = 862$).

- **6-karboxyfluorescein**

- a. Příprava bilirubin-10-merkptoethylaminu*

Cysteamin hydrochlorid (23 mg, 20,35 mmol) byl rozpuštěn ve 100 μ l 1M NaHCO₃. Biliverdin (6,6 mg, 0,011 mmol) byl rozpuštěn v 1 ml AcOEt a k roztoku byl přidán Et₃N (30 μ l, 0,200 mmol), vše bylo provedeno pod atmosférou argonu a za tmy. V dalším kroku byl cysteamin přidán k biliverdinu a ukončení reakce bylo indikováno změnou barvy reakční směsi z modrozelené na žlutohnědou. Pro malou stabilitu nebyl produkt izolován, pouze byl identifikován pomocí MS (ESI-MS, $m/z = 659,1$) a ihned použit pro další reakci.

- b. Konjugát bilirubin-10-merkptoethylaminu s 6-karboxyfluoresceinem*

Bilirubin-10-merkptoethylamin z předcházejícího kroku (6,6 mg, 0,01 mmol), 6-karboxyfluorescein (3,8 mg, 0,01 mmol), DCC (2 mg, 0,01 mmol), triethylamin (10 μ l, 0,067 mmol) a hydroxybenzotriazol (1,4 mg, 0,01 mmol) byly míchány v 1 ml bezvodého DMF za laboratorní teploty po dobu 24 hodin^[40]. Výsledná reakční směs byla analyzována pomocí MS (ESI-MS, $m/z = 1016,0$).

2. 3. 4. Konjugáty s esterovou vazbou

- **Dansyl-glycin**

- a. Příprava bilirubin-10-merkptoethanolu*

Biliverdin (18 mg, 0,03 mmol) byl rozpuštěn v 10 ml AcOEt, připipetován Et₃N (45 μ l, 0,30 mmol) a merkptoethanol (91 μ l, 0,70 mmol)^[41]. Po patnácti minutách míchání změnila reakční směs barvu z modrozelené na žlutohnědou. Směs byla odpařena za vakua a odparek zanalyzován pomocí hmotnostní spektrometrie (ESI-MS, $m/z = 659,2$).

b. Vznik aktivovaného esteru

Bilirubin-10-merkapt ethanol (10 mg, 0,015 mmol) byl rozpuštěn v 3 ml THF a míchán na magnetické míchače při 0°C. Pak byl přidán N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (3,1 mg, 0,013 mmol), dimethylaminopyridin (1,22 mg, 0,015 mmol) a dansyl-glycin (4,7 mg, 0,014 mmol)^[42] a reakční směs byla míchána přes noc. Ověření vzniku značeného bilirubinu bylo provedeno hmotnostní chromatografií (ESI-MS, $m/z = 950,33$).

- **6-karboxyfluorescein**

a. Příprava bilirubin-10-merkapt ethanolu

viz. postup výše u dansyl-glycinu.

b. Konjugát bilirubin-10-merkapt ethanol s 6-karboxyfluoresceinem

Bilirubin-10-merkapt ethanol (10 mg, 0,015 mmol) byl rozpuštěn v 3 ml THF a míchán na magnetické míchače při 0°C. Pak byl přidán N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (3,1 mg, 0,013 mmol), dimethylaminopyridin (1,22 mg, 0,015 mmol) a 6-karboxyfluorescein (5,64 mg, 0,015 mmol)^[42]. Surová reakční směs byla míchána přes noc a měřena hmotnostní spektrometrií (ESI-MS, $m/z = 1018,0$)

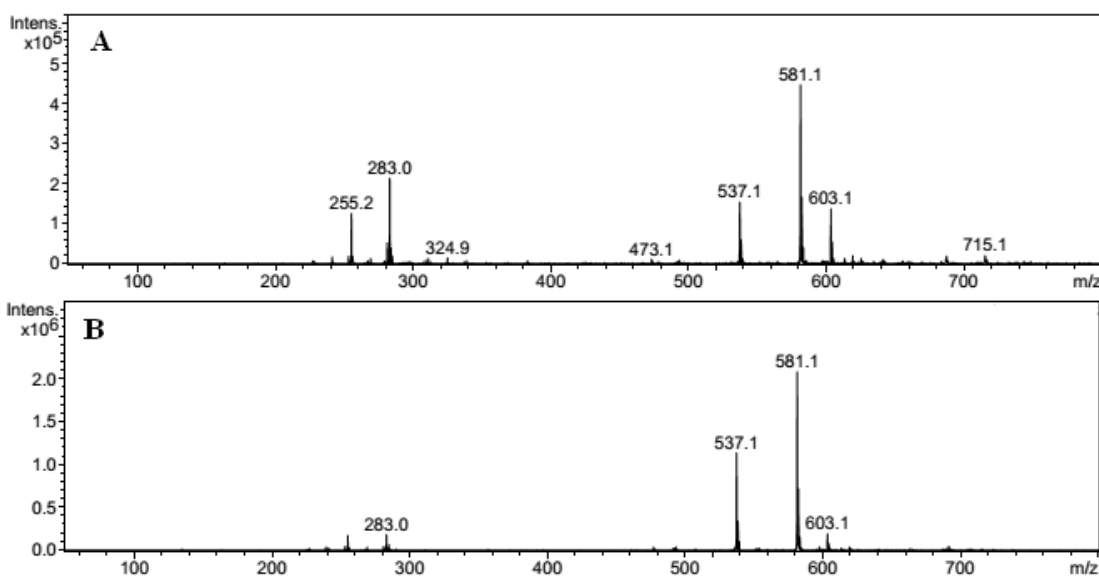
2. 3. 5. Ranarubin

Biliverdin.HCl (7 mg, 0,01 mmol) byl rozpuštěn v 1 ml butanolu, vyfoukán argonem a následně byl přidán 2M NaHSO₃ (0,05 ml, 0,10 mmol). Tato směs byla míchána 30 minut, poté bylo přidáno dalších 0,05 ml NaHSO₃ a ponecháno další hodinu míchat. Po hodině bylo přidáno sušidlo Na₂SO₄ (0,35 g) a po 15 minutách sušení byla směs přefiltrována přes vatku. Filtrát byl následně sražen diethyletherem a zcentrifugován. Po vysušení byl získán čistý produkt (4,9 mg, 70%), který byl analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie (ESI-MS, $m/z = 663,2$), nukleární magnetické rezonance, IR spektroskopie a ECD spektrometrie.

3. Výsledky, diskuse

3. 1. Purifikace biliverdinu IX α

Přečištění biliverdinu bylo provedeno za dodržení všech podmínek uvedených v literatuře. Ke srovnání čistoty komerčně dostupného biliverdinu před a po purifikaci byla použita analýza hmotnostní spektrometrií. Spektrum A je surový biliverdin, spektrum B biliverdin po purifikaci (obr. 24). Je patrné, že přečištění snížilo množství nečistot, výtěžek byl ale pouze 50%.



Obr. 24 ESI-MS – rozpouštědlo MeOH, negativní mód

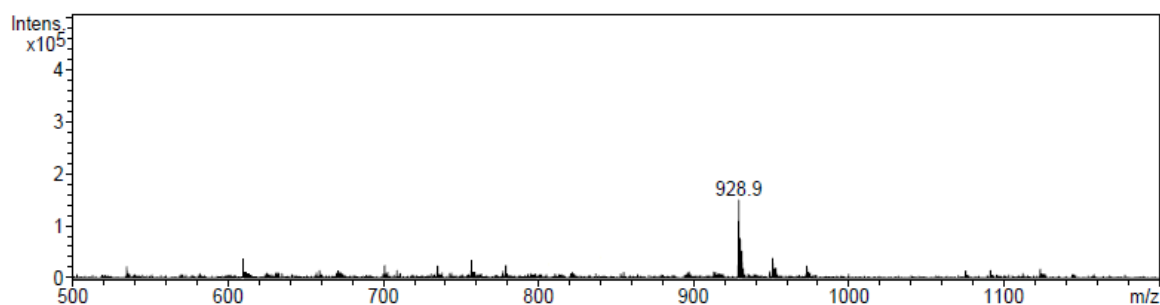
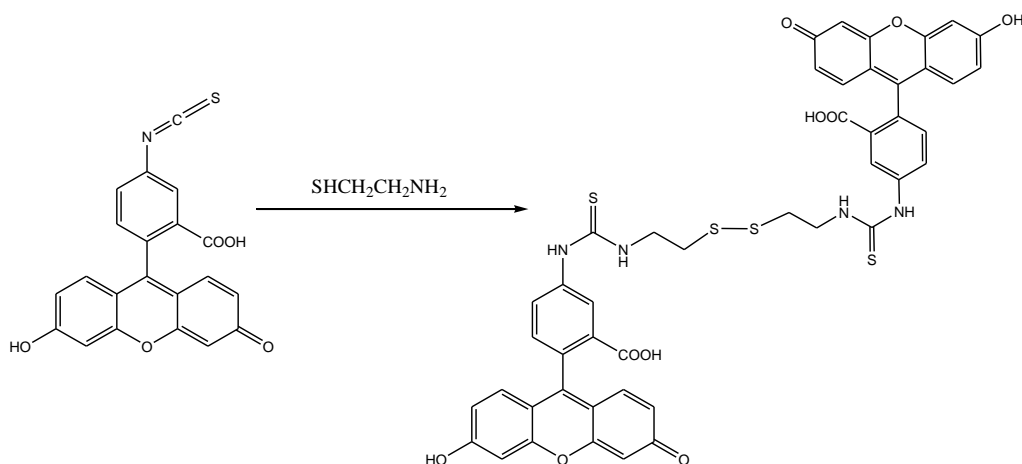
3. 2. Konjugáty s thiomocovinovou vazbou

3. 2. 1. FITC

V prvním kroku *a.* byl připraven fluorescein-disulfid (obr. 25), který byl v následující reakci *b.* zredukován na thiol FITC-CSA (obr. 26) pomocí dithiothreitolu. Z hmotnostních spekter je patrné, že vzniká kýžený meziprodukt. FITC-CSA byl nukleofilně adován na biliverdin za dodržení všech podmínek obsažených v literatuře (tma, argon, fyziologické pH). Fluorescenčně označený bilirubin byl analyzován

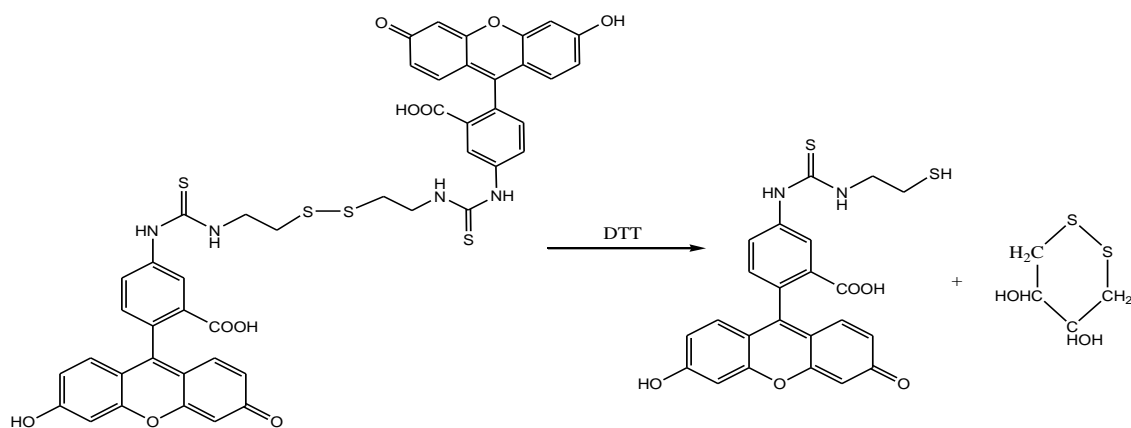
hmotnostní spektrometrií, konečnému produktu ve spektru náleží pík s hodnotou $m/z = 1047$ (obr. 27).

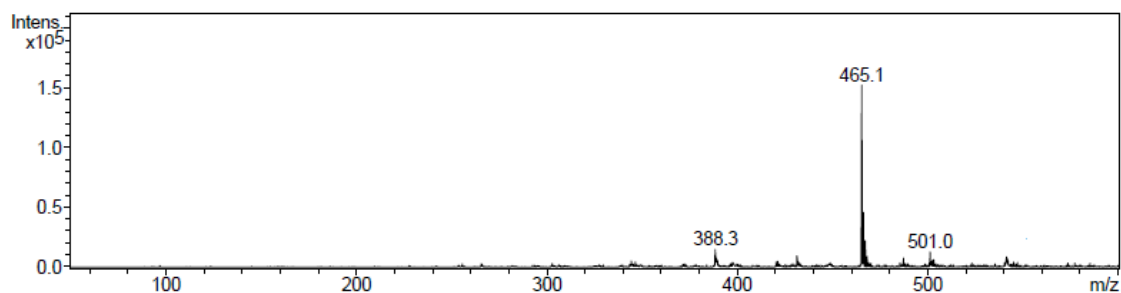
a. Příprava fluorescein-disulfidu



Obr. 25 ESI-MS – rozpouštědlo MeOH, [M⁺]: $m/z = 928,9$ (fluorescein-disulfid)

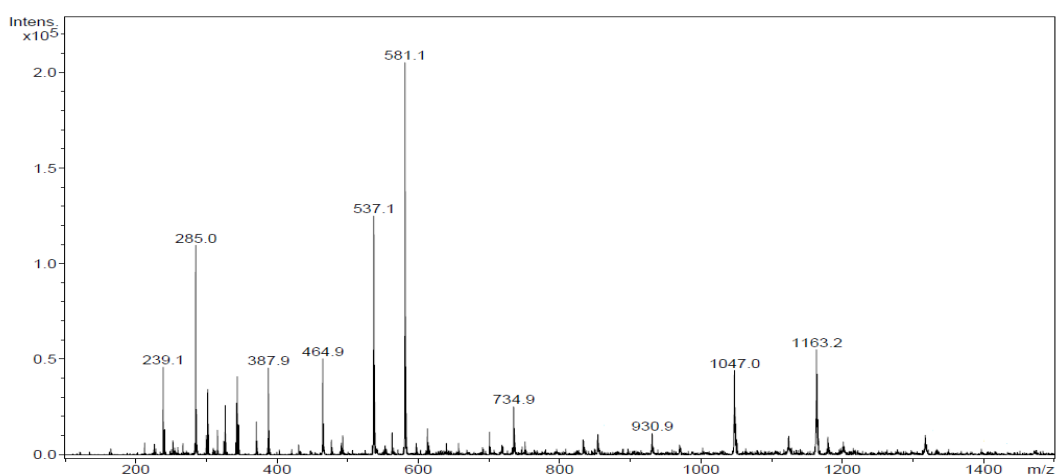
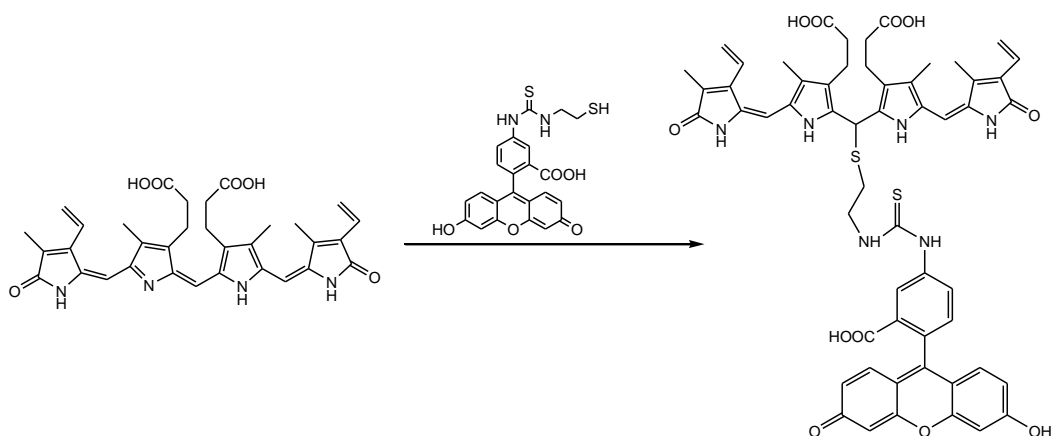
b. Redukce disulfidu





Obr. 26 ESI-MS - rozp. MeOH, [M]⁻: m/z = 465,1 (*FITC-CSA*)

c. *Adice na biliverdin*



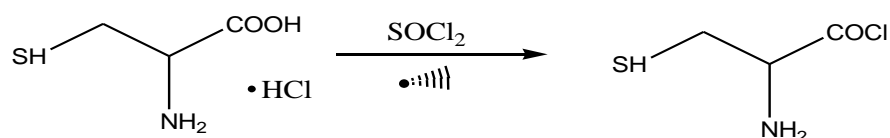
Obr. 27 ESI-MS - rozp. MeOH, [M]⁻: m/z = 1047,0 (*BR-FITC*), m/z = 581,1 (*biliverdin*), m/z = 537,1 (*1. dekarboxylace biliverdinu*), m/z = 464,9 (*FITC-CSA*), m/z = 387,9 (*FITC*)

3. 3. Konjugáty s amidickou vazbou

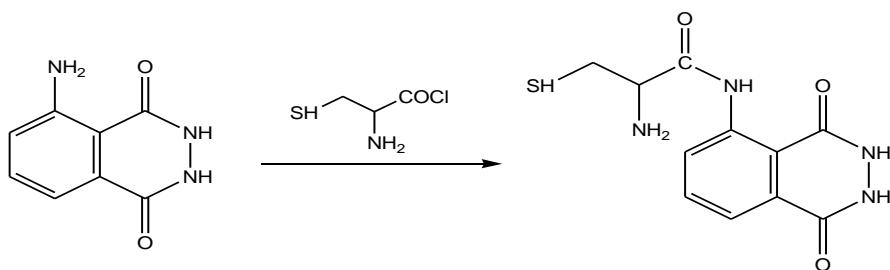
3. 3. 1. Luminol

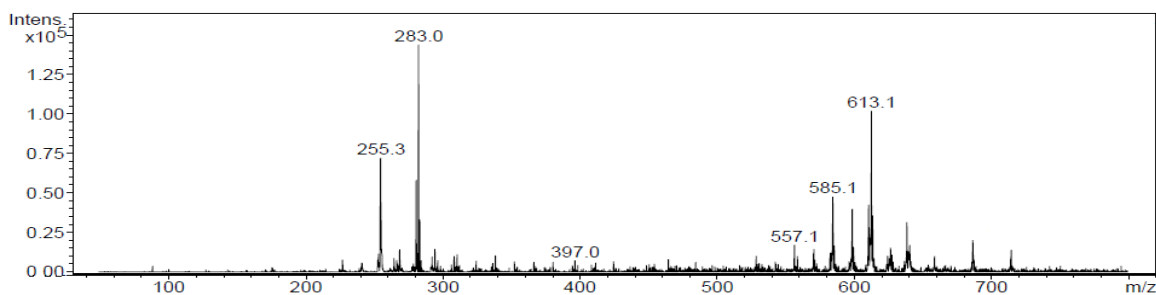
V prvním kroku byla karboxylová skupina L-cysteinu převedena na chlorid karboxylové kyseliny reakcí s thionylchloridem v ultrazvukové lázni. Pak postupným přikapáváním k luminolu vznikl vhodně upravený prekurzor Lumcys (*b1.*). V hmotnostním spektru mu odpovídá pík při $m/z = 283,0$ (obr. 28). V posledním kroku byla adována připravená látka na biliverdin a měla vzniknout označená sloučenina s molekulovou hmotností $M = 862$. Ve spektru jsou vidět fragmenty biliverdinu ($m/z = 581,1; 537,1$), hodnota $873,0$ sice neodpovídá kýženému produktu, ovšem z izotopového zastoupení u píku $m/z = 663,0$ je patrné, že fragment molekuly obsahuje navázaný atom síry (obr. 29). Strukturu vzniklé látky se nepodařilo objasnit stejně jako u 3. 2. 1. V případě reakčního kroku *b2.* byl na luminol za stejných reakčních podmínek vázán 3-chlor-propan-1-thiol, ovšem v hmotnostním spektru nebyl kromě píku, který odpovídal luminolu žádný jiný identifikován.

a. Chlorid L-cystein hydrochloridu (L-cys-Cl)



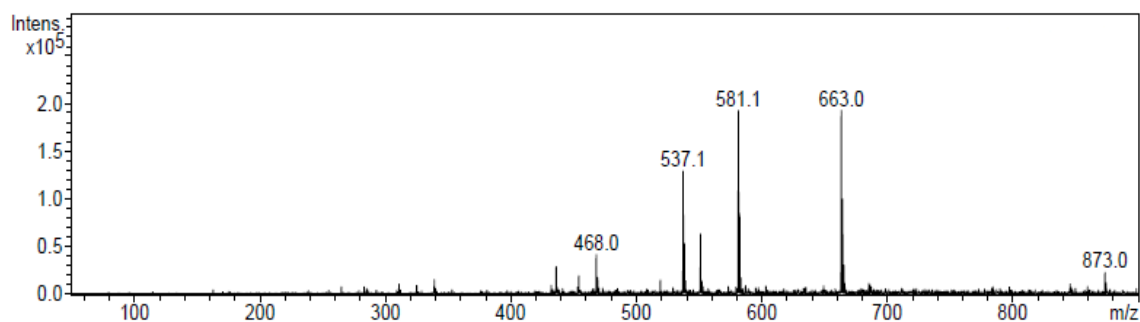
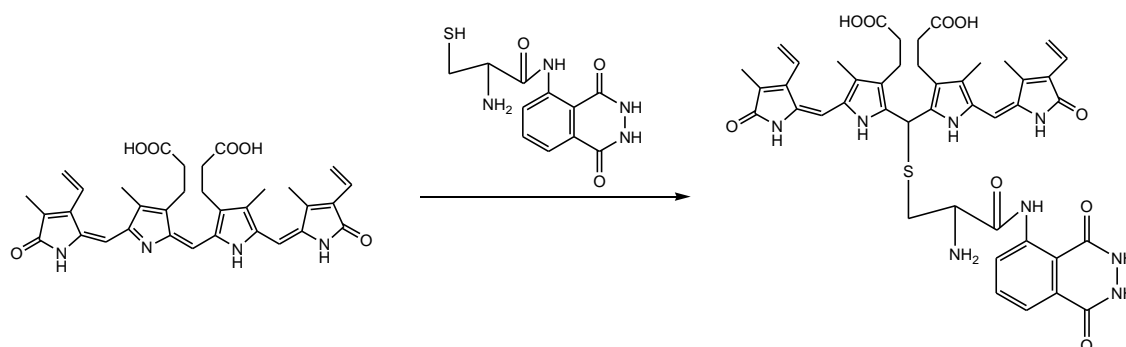
b. Reakce luminolu s L-cys-Cl (Lumcys)





Obr. 28 ESI-MS: [M]: $m/z = 283,0$ (*Lumcys*)

c. Adice Lumcys na biliverdin



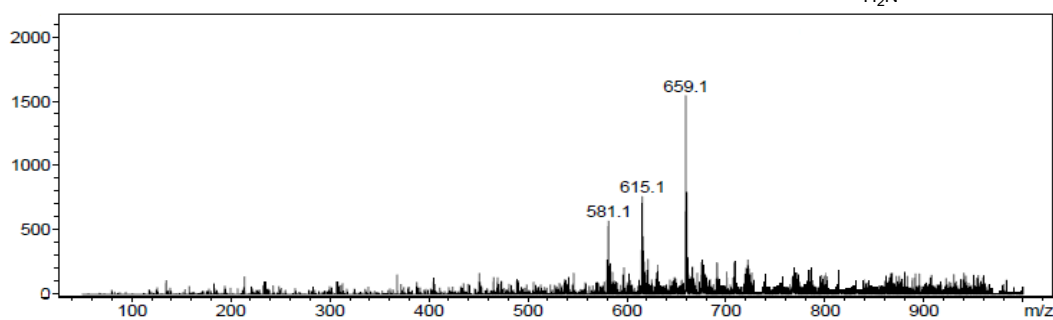
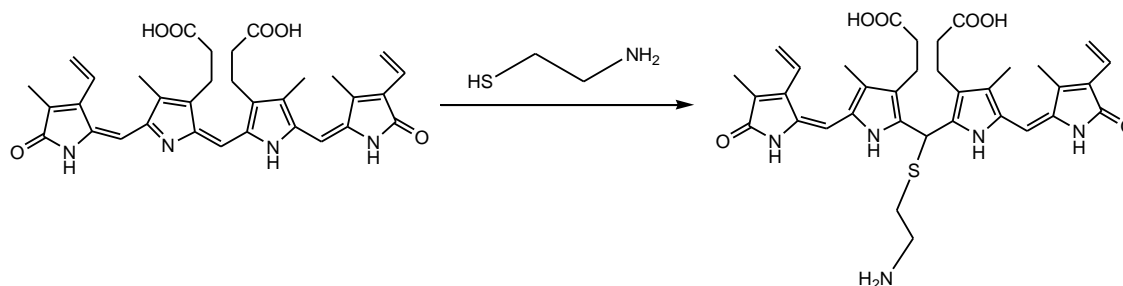
Obr. 29 ESI-MS: [M]: $m/z = 862$ (*BR-Lumcys*)

3. 3. 2. 6-karboxyfluorescein

Za vhodných reakčních podmínek byl připraven bilirubin-10-merkaptoethylenamin (obr. 30), který v dalším kroku reagoval s karboxyfluoresceinem za vytvořením amidické vazby mezi NH_2 skupinou bilirubinového derivátu a COOH skupinou karboxyfluoresceinu. Fragmentsy v hmotnostním spektru odpovídají biliverdinu, jeho dekarboxylačním stupňům a derivátům s cysteaminem ($m/z = 284,9; 537,2; 581,2;$

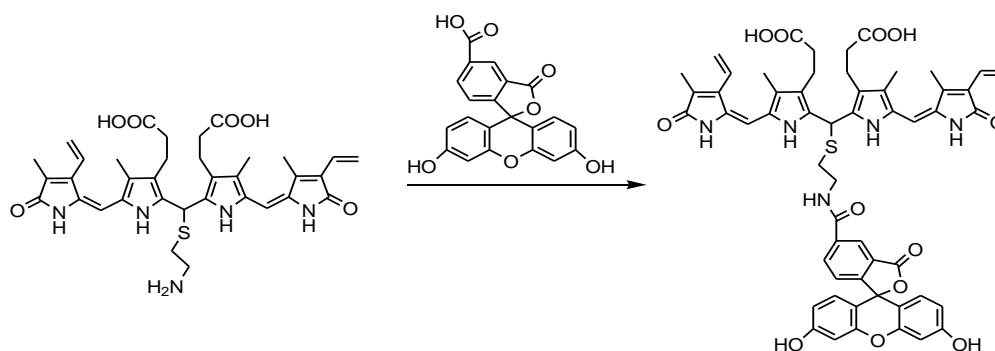
615,2; 737,2), pík s hodnotou 931,1 odpovídá dimeru karboxyfluoresceinu (obr. 31). V průběhu projektu se nepodařilo nalézt reakční podmínky, které by vedly ke vzniku cílového produktu, přestože by se mělo jednat o triviální reakci.

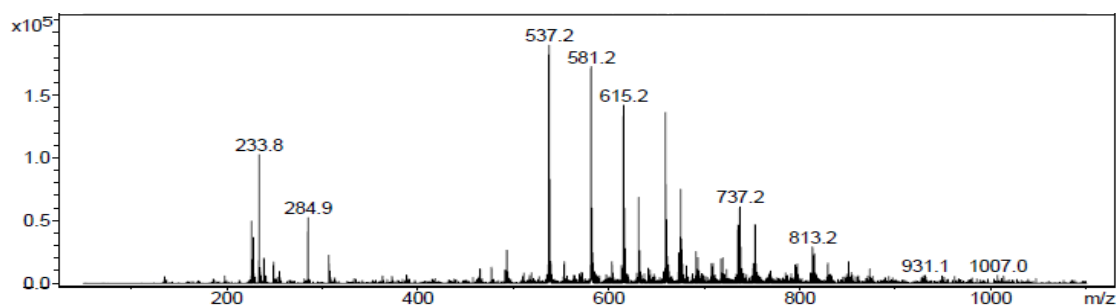
a. Příprava bilirubin-10-merkaptoethylaminu



Obr. 30 ESI-MS – rozp. MeOH, [M]⁺: m/z = 659,1 (*bilirubin-10-merkaptoethylamin*)

b. Vznik amidické vazby





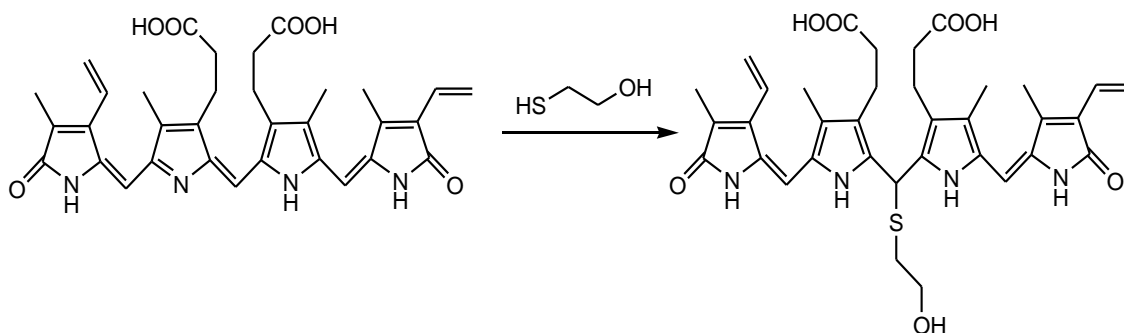
Obr. 31 ESI-MS - rozp. MeOH, [M]: $m/z = 1016,0$ (*BR-(N)-CF*)

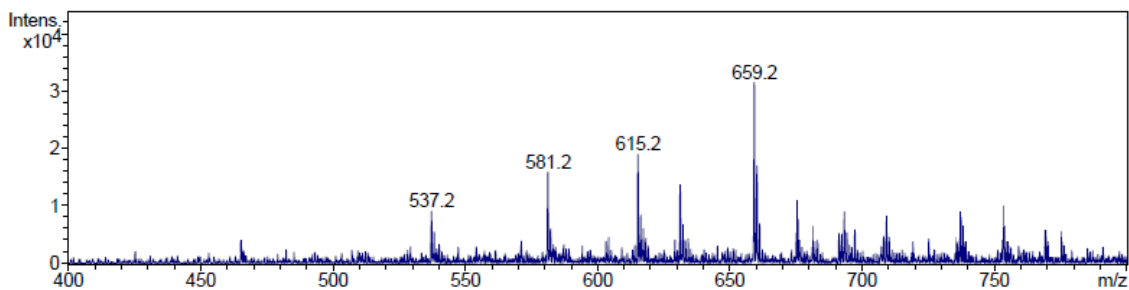
3. 4. Konjugáty s esterovou vazbou

3. 4. 1. Dansyl-glycin

Při přípravě konjugátů s esterovou vazbou byl nejdříve syntetizován derivát bilirubinu, který vznikl adicí merkaproethanolu na biliverdin. Reakce probíhala za podmínek – fyziologické pH, laboratorní teplota, tma a atmosféra argonu. Vzniklý derivát, bilirubin-10-merkptoethanol (obr. 32), byl použit v dalším postupu k vytvoření esterové vazby s dansyl-glycinem. Podle intenzity signálů v hmotnostním spektru je patrné, že je v reakční směsi volný biliverdin ($m/z = 581,1$), volný dansyl-glycin ($m/z = 306,8$), bilirubin-10-merkptoethanol ($m/z = 659,1$). Přítomnost aduktu BR-DAG ($m/z = 950,3$) je sporná (obr. 33). Pokud je látka přítomna v reakční směsi, tak je pouze v zanedbatelném množství.

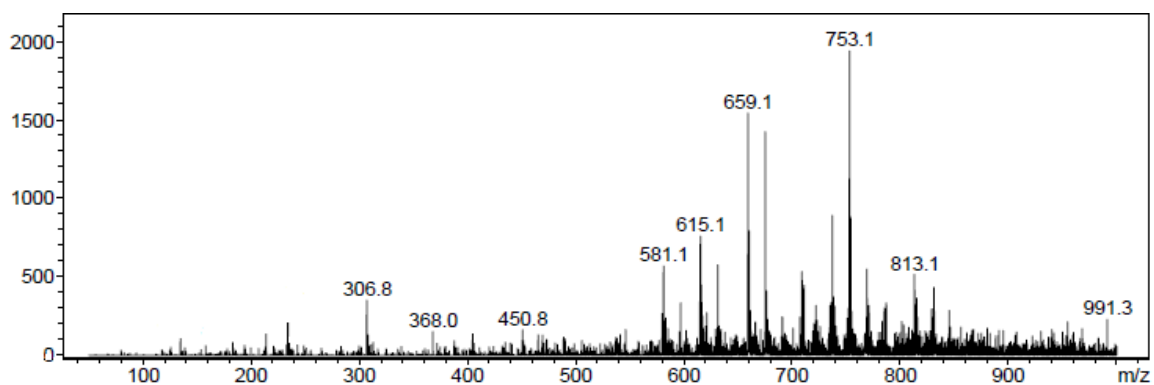
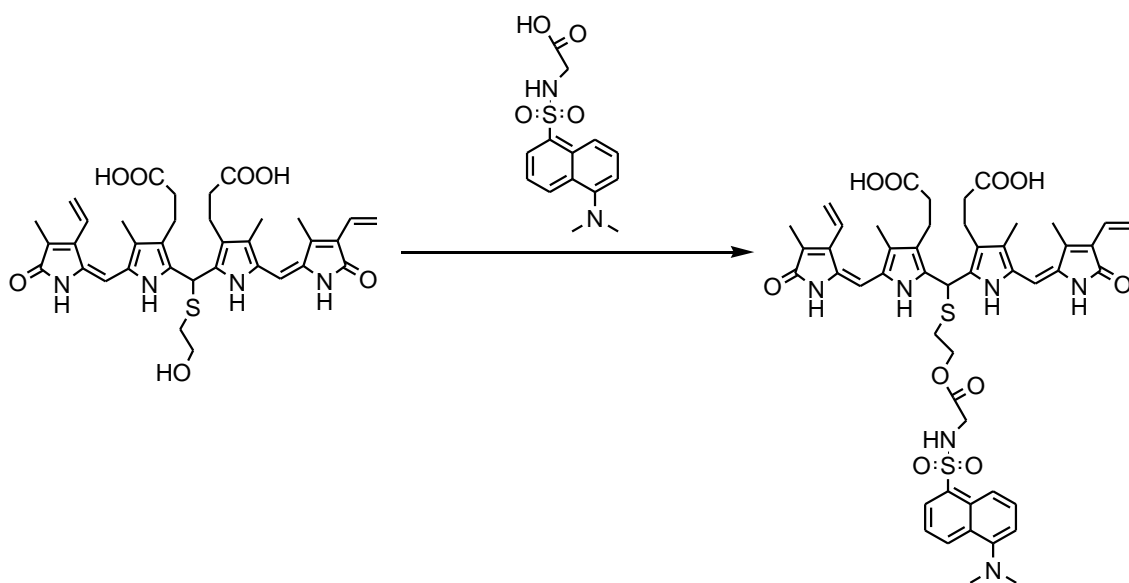
a. Příprava bilirubin-10-merkptoethanolu





Obr. 32 ESI-MS – rozp. MeOH, [M]: m/z = 659,2 (*bilirubin-10-merkaptoethanol*)

b. Vznik aktivovaného esteru

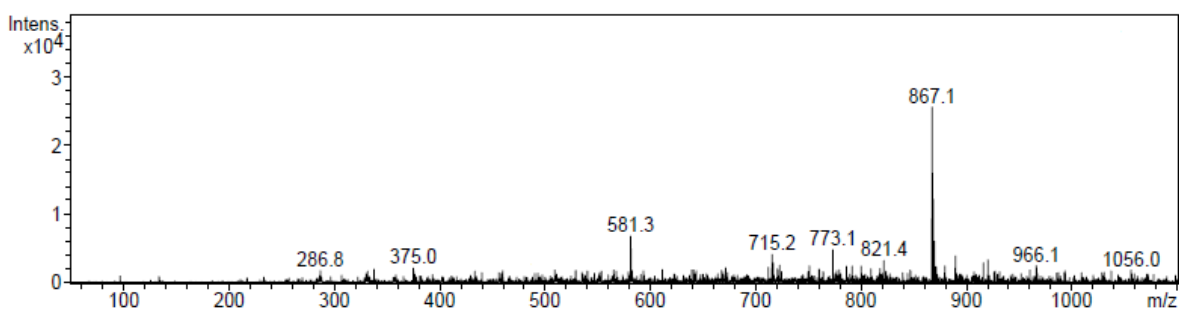
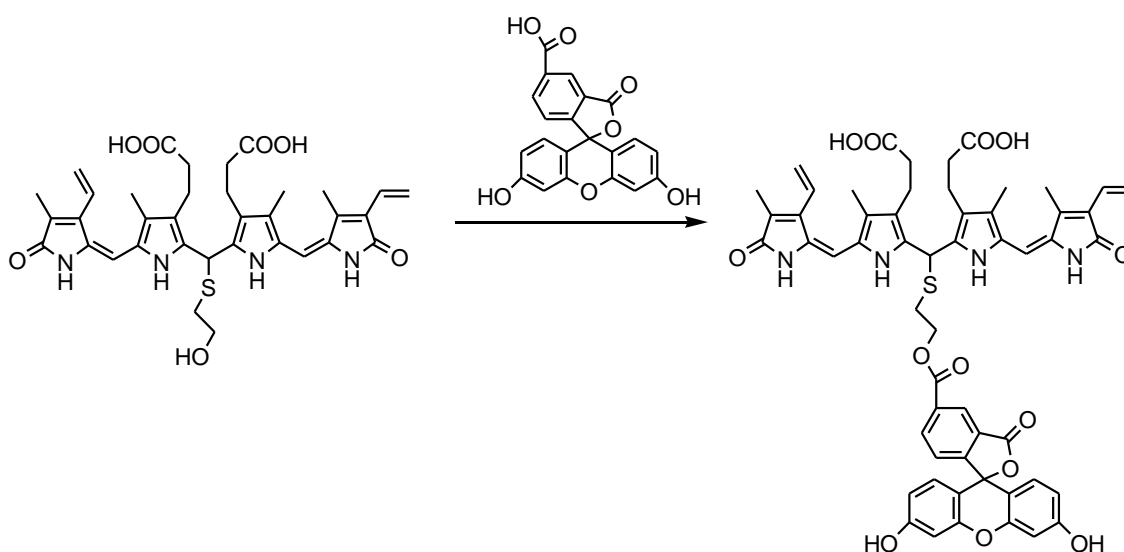


Obr. 33 ESI-MS – rozp. MeOH, [M]: m/z = 950,3 (*BR-DAG*)

3. 4. 2. 6-karboxyfluorescein

První krok, adice merkptoethanolu na biliverdin, byl stejný jako v oddílu 3. 4. 1. Derivát bilirubin-10-merkptoethanolu byl ponechán reagovat s karboxyfluoresceinem, kdy by měla vznikat látka s esterově vázaným fluorescenčním barvivem. MS analýzou reakční směsi byla prokázána pouze přítomnost biliverdinu $m/z = 581,3$ (obr. 34), ostatní signály se nepodařilo identifikovat a ani najít signál očekávaného produktu.

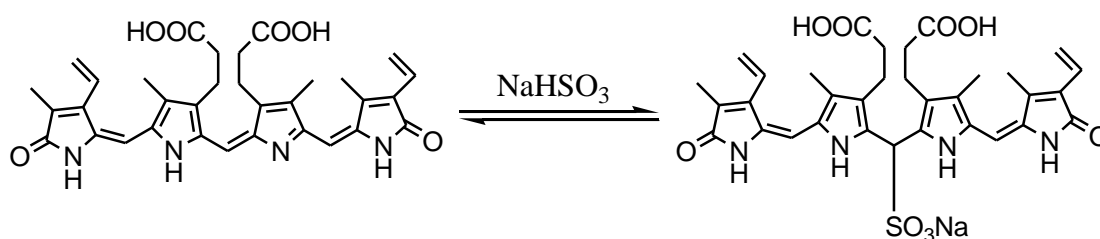
b. Vznik esterové vazby



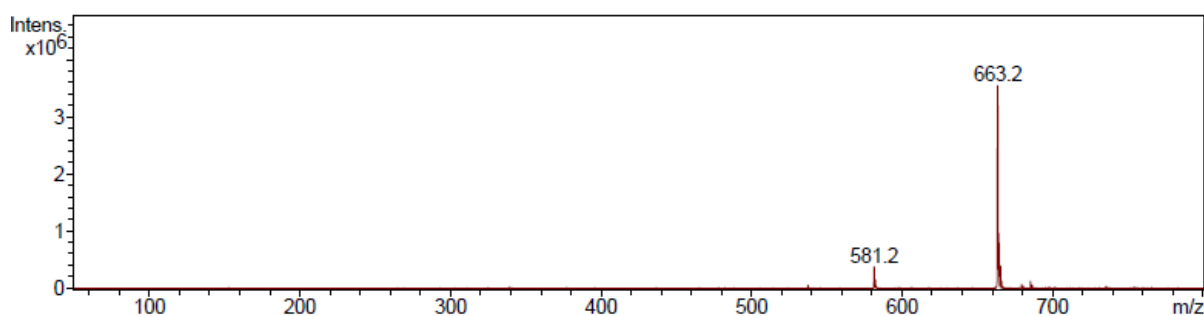
Obr. 34 ESI-MS – rozp. MeOH, $[M]^+$: $m/z = 1018,3$ (BR-(O)-CF)

3. 5. Ranarubin

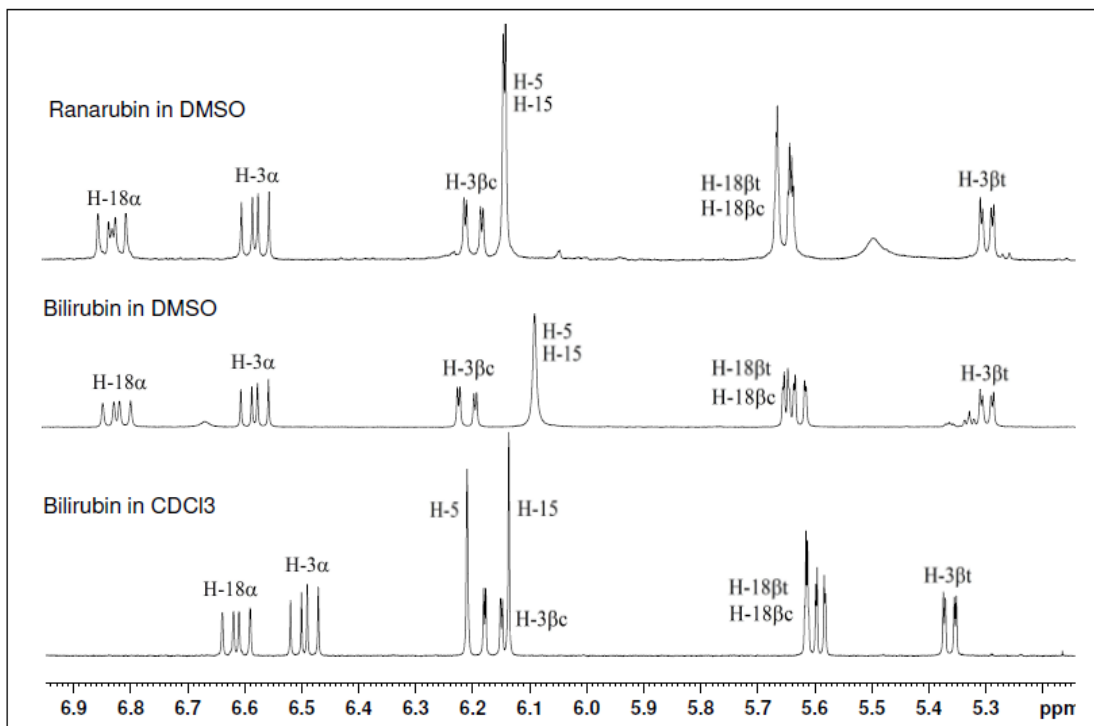
Ranarubin byl připraven adicí hydrogensířičitanu sodného na biliverdin (obr. 35). Změna barvy reakční směsi indikovala konec reakce. Izolace konečného produktu byla provedena sražením směsi pomocí diethyletheru. Vznik ranarubinu byl dokázán hmotnostní spektrometrií (obr. 36), stejně tak i jeho čistota (4,9 mg, 70%). Pomocí nukleární magnetické rezonance se podařilo dokázat rozdíl mezi strukturou bilirubinu a ranarubinu (obr. 37). Jedná se sice jen o malý rozdíl v posunu atomů vodíku H5 a H15, menší než 0,05 ppm. Tento rozdíl byl potvrzen ještě další analýzou – IR spektrem (obr. 38).



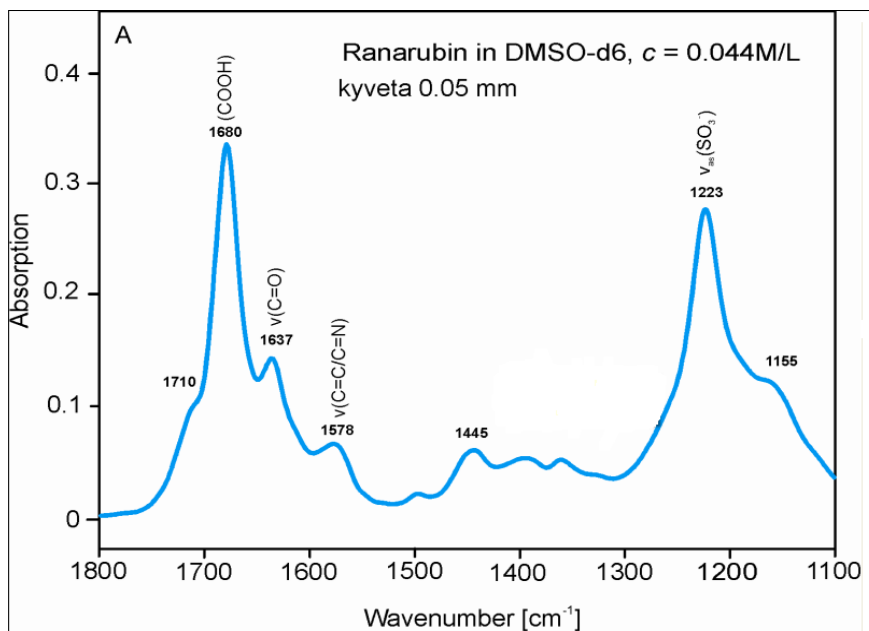
Obr. 35 Adice hydrogensířičitanu sodného na biliverdin



Obr. 36 ESI-MS – rozp. MeOH, $[\text{M}]^-$: $m/z = 663,2$ (bilirubin-10-sulfonát sodný)



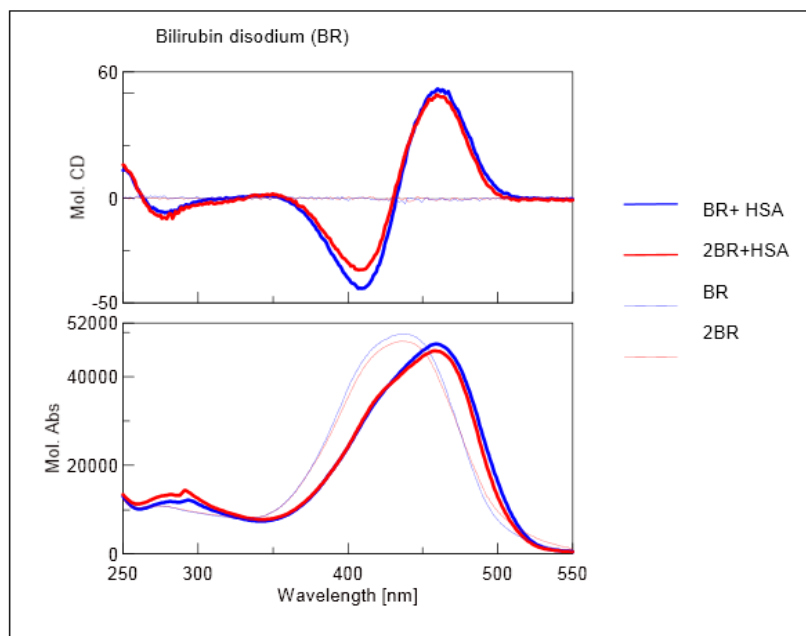
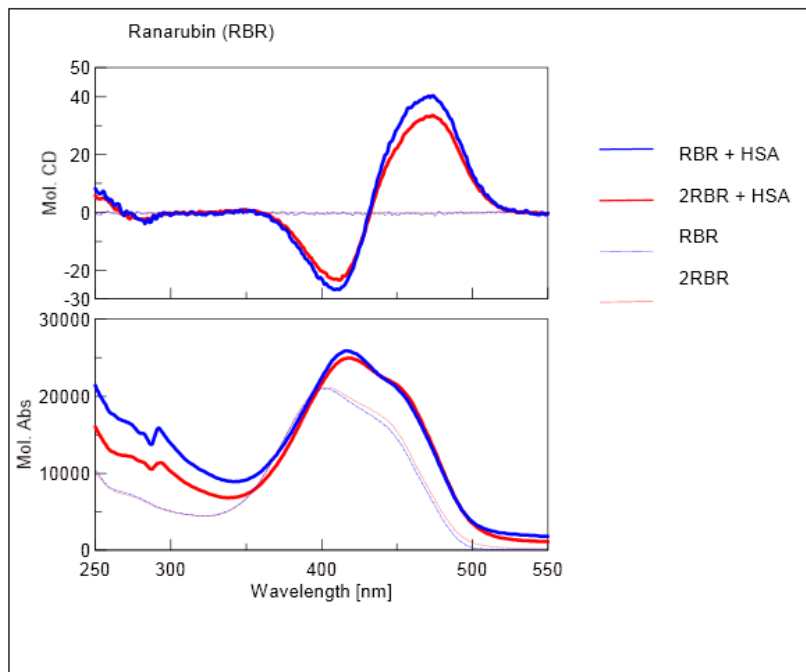
Obr. 37 NMR – rozpouštědlo DMSO



Obr. 38 IR spektrum – rozpouštědlo DMSO

Hmotnostní spektrometrie, nukleární magnetická rezonance a infračervené spektrum potvrdily strukturu ranarubinu a určily její odlišnosti od struktury bilirubinu. Poslední

analýza, která byla provedena, řešila otázku podobnosti vazby ranarubinu a bilirubinu na transportní protein albumin - měření ECD spekter (obr. 39).



Obr. 39 Srovnání ECD spekter ranarubinu a bilirubinu

Spektra jsou normována na koncentraci c pigmentu v mol/l a tloušťku kyvety l (cm),

$$\varepsilon = A/c l, \Delta\varepsilon = \Delta A/c l, c(\text{HSA}) = 1,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l.}$$

ECD spektra ranarubinu s lidským sérovým albuminem HSA byla srovnána s bilirubinem navázaným na HSA. Molární absorpční koeficient pro ranarubin vychází nižší než pro BR (může být způsobeno příměsemi, které jsou v navážce ranarubinu, ale nevykazují v této oblasti absorpci). Samotné pigmenty bez HSA nevykazují ECD (tenká čára podél nuly). ECD signál ranarubinu s HSA má obdobný průběh jako pro UCB s HSA. Intenzita je menší než pro UCB přibližně ve stejném poměru jako u absorpce. Stejný průběh ECD svědčí o tom, že chromofory obou barviv se uspořádávají při vazbě na HSA podobně.

Bylo tedy dokázáno, že ranarubin se strukturně liší od bilirubinu, avšak chování ve vazbě na albumin je obdobné.

4. Závěr

Byly připraveny prekurzory pro fluorescenční značení bilirubinu, ovšem pro nízkou stabilitu žlučových pigmentů na vzduchu, světle, při vyšší teplotě a výkyvech pH nebylo možno tyto produkty izolovat ze surové reakční směsi a zpracovat pro další možné výzkumy. V některých případech se podařilo bilirubin opatřit fluorescenční značkou, produkty však vykazovaly vysokou nestabilitu a při dalším zpracování a analýze docházelo k rozkladu na výchozí látky a další sloučeniny, které však nebylo možno identifikovat.

Adicí hydrogensířičitanu sodného na biliverdin byl připraven ranarubin. Jeho struktura byla potvrzena hmotnostní spektrometrií, nukleární magnetickou rezonancí a IR spektrem. Díky těmto analýzám byla dokázána jeho strukturální odlišnost od bilirubinu. Ovšem pomocí cirkulárních dichroismů (ECD spektra) bylo dokázáno, že při vazbě na transportní protein albumin se chová ranarubin obdobně jako bilirubin. Tyto poznatky je možno s výhodou aplikovat při dalším výzkumu značení bilirubinových derivátů.

5. Seznam použité literatury

1. Vitek, L., *Bilirubin a interní choroby*, ed. D. Váchová 2009, Praha: Grada Publishing, a.s. 128.
2. McDonagh, A.F., *Thermal and photochemical reactions of bilirubin IX-alpha*. Ann N Y Acad Sci, 1975. **244**: p. 553-69.
3. Kaur, H., et al., *Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species*. FEBS Lett, 2003. **543**(1-3): p. 113-9.
4. McDonagh, A.F., *Phototherapy for neonatal jaundice. Configurational isomers of bilirubin*. J. Am. Chem. Soc., 1982. **104**: p. 6865-6867.
5. Hwang Ki-Oh, A.D.T., Lightner David A., *Synthesis and properties of bilirubin analogs with N,N-methylene bridges*. Tetrahedron, 1994. **50**(33): p. 9919-9932.
6. Stoll, M.S. and C.H. Gray, *The preparation and characterization of bile pigments*. Biochem J, 1977. **163**(1): p. 59-101.
7. McDonagh, A.F. and F. Assisi, *Commercial bilirubin: A trinity of isomers*. FEBS Lett, 1971. **18**(2): p. 315-317.
8. Manitto, P. and D. Monti, *Acid-catalyzed addition of alcohols and thiols to bilirubin*. Experientia, 1973. **29**(2): p. 137-9.
9. David, D., *The Porphyrins*, in *Biochemistry* 1979: New York.
10. Wooldridge, T., Lightner D. A., *Separation of the III-a, IX-a, XIII-a isomers of bilirubin and bilirubin dimethyl ester by high performance liquid chromatography* Journal of Liquid Chromatography, 1978. **1**(5): p. 653-568.
11. DiCesare, J.L., Vandemark, F. L., *High resolution preparative LC separation of bilirubin isomers*. Chromatography newsletter, 1981. **9**(1): p. 7-10.
12. Lucey, J.F., *Neonatal phototherapy: uses, problems, and questions*. Semin Hematol, 1972. **9**(2): p. 127-35.
13. Schmid, R., *Hyperbilirubinemia*. 3rd ed. In the metabolic basis of inherited disease 1972, New York: McGraw-Hill.
14. Compennolle, F., *Synthesis of biliverdin and bilirubin 1-O-acyl-beta-D-glucopyranuronic acids*. Biochem J, 1980. **187**(3): p. 857-62.
15. Jinshi, M., Fang, Y., Changqi, W., Jinhua, Ch., *Addition of sodium bisulfite to biliverdin*. Chinese Chemical Letters, 1990. **1**(2): p. 171-172.
16. Jackson, A.H., Kenner, G. W., *Pyrroles and related compounds*. Tetrahedron, 1967. **23**: p. 603-632.
17. Hayashida, O., N. Ogawa, and M. Uchiyama, *Surface recognition and fluorescence sensing of histone by dansyl-appended cyclophane-based resorcinarene trimer*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(44): p. 13698-705.
18. Banks, P.R. and D.M. Paquette, *Comparison of three common amine reactive fluorescent probes used for conjugation to biomolecules by capillary zone electrophoresis*. Bioconjug Chem, 1995. **6**(4): p. 447-58.
19. Tsunoda, M., *Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites*. Anal Bioanal Chem, 2006. **386**(3): p. 506-14.

20. Gamiz-Gracia, L., et al., *Chemiluminescence detection in liquid chromatography: applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis--a review*. Anal Chim Acta, 2009. **640**(1-2): p. 7-28.
21. Goldys, E.M., Drozdowicz-Tomsia, K., Zhu, G., Yu, H., Jinjun, S., Motlan, M., Godlewski, M., *Fluorescence labelling*. Optica applicata, 2006. **36**(2-3): p. 217-224.
22. Fišar, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*. 2003; Available from: <http://www1.lfl.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>.
23. Dubey, I., G. Prativiel, and B. Meunier, *Modification of the thiourea linkage of a fluorescein-oligonucleotide conjugate to a guanidinium motif during ammonia deprotection*. Bioconjug Chem, 1998. **9**(5): p. 627-32.
24. Scientific, T. *Fluorescent probes*. 2013; Available from: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4DD9D52E-5056-8A76-4E6E-E217FAD0D86B>.
25. Haugland, R.P., *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*, M. Probes, Editor 1996.
26. Muramoto, K., Kamiya, Hisao, Kawauchi, Hiroshi, Meguro, Hiroshi, *High performance liquid chromatography of fluorescein isothiocyanate isomers and intermediate products*. Analytical Science, 1985. **1**: p. 447-450.
27. Ballou, B., et al., *Noninvasive imaging of quantum dots in mice*. Bioconjug Chem, 2004. **15**(1): p. 79-86.
28. Mahendra, S., et al., *Quantum dot weathering results in microbial toxicity*. Environ Sci Technol, 2008. **42**(24): p. 9424-30.
29. Peck, K., et al., *Single-molecule fluorescence detection: autocorrelation criterion and experimental realization with phycoerythrin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(11): p. 4087-91.
30. Zill, A.T., Licha, K., Haag, R., Zimmerman, S. C., *Synthesis and properties of fluorescent dyes conjugated to hyperbranched polyglycerols*. New J. Chem., 2012. **36**: p. 419-427.
31. Gok, E. and S. Olgaz, *Binding of fluorescein isothiocyanate to insulin: a fluorimetric labeling study*. J Fluoresc, 2004. **14**(2): p. 203-6.
32. Morii, T., et al., *A new fluorescent biosensor for inositol trisphosphate*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(7): p. 1138-9.
33. Davis, A., *Dansylglycine as a fluorescent probe for aqueous solutions of cationic detergents*. JACS, 1972: p. 5089-5090.
34. Gorman, J.J., G.L. Corino, and S.J. Mitchell, *Fluorescent labeling of cysteinyl residues. Application to extensive primary structure analysis of proteins on a microscale*. Eur J Biochem, 1987. **168**(1): p. 169-79.
35. Falk, H., Mueller, N., Shleiderer, T., *Contributions to the chemistry of pyrrole pigments. Part XXXV: A regioselective reversible addition to bilatrienes-abc*. Monatshefte fuer Chemie, 1980. **111**(1): p. 159-175.
36. Manitto, M.P., Monti, D., *Addition of sulphydryl groups to biliverdin*. Experientia, 1979. **35**: p. 1418-1420.

37. Cleland, W.W., *Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups*. *Biochemistry*, 1963. **3**(4): p. 480-482.
38. Getz, E.B., et al., *A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry*. *Anal Biochem*, 1999. **273**(1): p. 73-80.
39. Hansen, R.E. and J.R. Winther, *An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations*. *Anal Biochem*, 2009. **394**(2): p. 147-58.
40. Shiu, H.Y., et al., *A highly selective FRET-based fluorescent probe for detection of cysteine and homocysteine*. *Chemistry*. **16**(11): p. 3308-13.
41. Salami, S., et al., *Synthesis of water-soluble bile pigments bound to amine-ended monomethoxypolyethyleneglycol: thiol addition and attempted enzymatic reduction of a bilindione derivative*. *Cell Mol Life Sci*, 1997. **53**(3): p. 248-6.
42. Nomura, W., et al., *Fluorescence-quenching screening of protein kinase C ligands with an environmentally sensitive fluorophore*. *Bioconjug Chem*. **22**(5): p. 923-30.