

Universita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Lucie Surá

**Propustnost lipidové membrány pro dvojmocné ionty
- testování ionoforu 4-Br A₂₃₁₈₇**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

Studijní program: Fyzika, obecná fyzika

2007

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své bakalářské práce za ochotu, trpělivost a připomínky k mé práci.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci sepsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze dne

Lucie Surá

Obsah

1 Úvod	5
2 Teoretická část	6
2.1 Fluorescence.....	6
2.2 Fluorescenční sondy.....	7
2.3 Kovy a jejich biologická funkce.....	8
2.4 Přenos látek přes lipidovou membránu.....	8
2.5 Transport Me^{2+} pomocí 4-Br A_{23187} , A_{23187} a ionomycinu.....	9
3 Materiál a metody	12
3.1 Fluorescenční měření.....	12
3.2 Použité roztoky.....	12
3.3 Příprava liposomů.....	12
4 Výsledky a diskuse	14
4.1 Spektra fura-2 v přítomnosti Me^{2+}	14
4.2 Ionofor A_{23187}	16
4.3 Gelová filtrace liposomů.....	17
4.4 Kalibrace.....	18
4.5 Kinetika transportu.....	22
5 Závěr	25
Literatura	26

Název práce: Propustnost lipidové membrány pro dvojmocné ionty
- testování ionoforu 4-Br A₂₃₁₈₇

Autor: Lucie Surá

Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

e-mail vedoucího: roman.chaloupka@mff.cuni.cz

Abstrakt: V předložené práci studujeme membránový transport Cd²⁺, Co²⁺ a Mn²⁺ pomocí 4-Br A₂₃₁₈₇ a ionomycinu na modelovém systému liposomů naplněných fluorescenční sondou fura-2. Při přípravě liposomů jsme dosáhli dostatečného odmytí vnější fura-2, abychom mohli provádět samotná měření. Zjistili jsme, že systém liposomů s fura-2 je stabilní minimálně po 30 hodin. Bylo zjištěno, že ionomycin transportuje při nízkých koncentracích dvojmocných iontů tyto ionty rychleji než 4-Br A₂₃₁₈₇. Dokázali jsme, že Cd²⁺ je přes lipidovou membránu přenášeno jak 4-Br A₂₃₁₈₇ tak i ionomycinem, avšak transport je pomalejší a slabší než u Co²⁺ a Mn²⁺. Při pH 7,49 a 100 μM koncentraci dvojmocných iontů ukazují 4-Br A₂₃₁₈₇ i ionomycin stejnou selektivitu transportu: Mn²⁺ > Co²⁺ > Cd²⁺.

Klíčová slova: 4-Br A₂₃₁₈₇, ionomycin, dvojmocné ionty, fura-2, membránový transport

Title: Permeability of lipid membrane for divalent cations
-testing of ionofor 4-Br A₂₃₁₈₇

Author: Lucie Surá

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Roman Chaloupka, Ph.D.

Supervisor's e-mail address: roman.chaloupka@mff.cuni.cz

Abstract: In this study, we test membrane transport of Cd²⁺, Co²⁺ and Mn²⁺ by 4-Br A₂₃₁₈₇ and ionomycin using a model system comprised of liposomes loaded by fluorescent probe fura-2. Sufficient removal of extravesicular fura-2 was reached during the preparation of phospholipid vesicles. System of liposomes and fura-2 is stable at least for 30 hours. At low concentration of divalent cations, the ionomycin transport rate is faster compared to the 4-Br A₂₃₁₈₇ transport rate. It was proved that Cd²⁺ is transported into fura-2 loaded vesicles by ionomycin and 4-Br A₂₃₁₈₇, however this transport is slower and less efficient compared to Co²⁺ and Mn²⁺ transport. At pH 7,49 and 100 μM cation concentration, 4-Br A₂₃₁₈₇ and ionomycin display the same transport selectivity sequence: Mn²⁺ > Co²⁺ > Cd²⁺.

Keywords: 4-Br A₂₃₁₈₇, ionomycin, divalent cations, fura-2, membrane transport

Kapitola 1

Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá propustností lipidové membrány pro dvojmocné kovové ionty. Testována bude fluorescenční odezva vybrané fluorescenční sondy s těmito kovy: Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} . Jako modelový systém pro průchod kovů přes lipidovou membránu budou použity unilamelární liposomy, naplněné vhodnou fluorescenční sondou, v roztoku pufru o konstantním pH. Cílem této práce je otestovat tři ionofory (A_{23187} , 4-Br A_{23187} , ionomycin) s vybranými dvojmocnými ionty. Z dřívějších prací je známo, že tyto ionofory přenášejí s různou selektivitou různé dvojmocných kovy. My svou pozornost soustředíme na transport Cd^{2+} . Transport tohoto kovu pomocí ionoforu 4-Br A_{23187} ještě nebyl více studován. Proto je jedním z cílů této práce zjistit, jestli je vůbec tento kovový iont tímto ionoforem přes lipidovou membránu přenášen. Pokud tomu tak je, budeme chtít porovnat kinetiku tohoto transportu s některým kovem, který již byl s tímto ionoforem studován a víme o něm, že je pomocí 4-Br A_{23187} přenášen.

Vzhledem k tomu, že se laboratoř zabývá studiem transportéru MntH *Escherichia coli* a do budoucna je zájem studovat tento transportér na modelovém systému liposomů s fluorescenční sondou fura-2, dalším cílem této práce je otestovat fluorescenční odezvu fura-2 (uzavřenou v liposomech) na dvojmocné kovové ionty. Fluorescenční spektra i kinetiku transportu budeme studovat spektroskopicky.

Tato práce je rozčleněna do pěti kapitol. V druhé kapitole jsou shrnuty nejdůležitější teoretické poznatky důležité k pochopení problematiky této práce a také se zabývá publikovanými výzkumy v této oblasti. Třetí kapitola uvádí metody a materiál použité při experimentální části této bakalářské práce. Ve čtvrté kapitole se nachází popis měření, která byla provedena, a jsou zde také diskutovány výsledky těchto měření. Pátou kapitolu tvoří shrnutí poznatků této práce.

Kapitola 2

Teoretická část

2.1 Fluorescence

Fluorescence a fosforescence tvoří dvě základní kategorie širšího jevu: luminescence. Fluorescence je zářivý přechod zpravidla z rovnovážné vibrační hladiny některého excitovaného singletního stavu do některé z vibračních hladin základního stavu. Pravděpodobnost takového přechodu je docela velká a průměrná doba života elektronu v excitovaném stavu je jen 10^{-5} - 10^{-8} s. Fosforescencí molekul se rozumí zářivý přechod z nejnižšího většinou tripletního excitovaného stavu do singletního stavu základního. Ve srovnání s fluorescencí má fosforescence dlouhou dobu dohasínání 10^2 - 10^{-4} s. [1 str. 387, 2 str. 425]

Kvantitativní veličina popisující schopnosti fluorescence je kvantový výtěžek Φ , který je definován jako počet emitovaných fotonů ku počtu absorbovaných fotonů za jednotku času. Hodnota kvantového výtěžku může být ovlivněna vnějšími faktory jako jsou teplota a charakter rozpouštědla. Zvyšování teploty obecně snižuje kvantový výtěžek, protože častější kolize mezi molekulami a rozpouštědlem zvyšují podíl nezářivých přechodů na deexcitaci. Ze stejného důvodu snižuje kvantový výtěžek i snížení viskozity rozpouštědla. Protože fluorescence může vrátit molekulu do jakékoli vibrační hladiny základního stavu, objevuje se v širokém pásmu vlnových délek. Fluorescenční spektrum je oproti absorpčnímu spektru posunuto směrem k vyšším vlnovým délkám, protože energetická změna při fluorescenci je obecně menší než při absorpci. [1 str.387-390, 2 str. 426-427]

V biofyzice se fluorescence využívá při studiu struktury a dynamiky nukleových kyselin, proteinů či buněčných organel, s její pomocí lze měřit i vnitrobuněčné pH a koncentrace iontů uvnitř buněk. Mezi hlavní výhody fluorescenčních měřících metod patří jejich vysoká citlivost, díky které k měření stačí nízká koncentrace fluorescenční látky ve vzorku a možnost sledování rychlých

změn měřených veličin. Během měření nedochází k poškození vzorku ani ke vzniku nežádoucích vedlejších produktů. [3, 4, 5]

2.2 Fluorescenční sondy

Nezbytnou podmínkou pro fluorescenční měření na nějakém biologickém systému je přítomnost fluorescenčního barviva (fluoroforu) na správném místě. Některé systémy obsahují přirozené vlastní fluorofory, jako je např. chinin či tryptofan. Daleko hojněji se však používá nevlastních fluoroforů s dobře definovanými chemickými i fluorescenčními vlastnostmi, které se přidají ke studovanému systému. Pokud se tyto fluorescentní molekuly váží nekovalentně, nazýváme je fluorescenčními sondami, jsou-li navázány kovalentně mluvíme o fluorescenčních značkách. [1 str. 425, 5]

Fluorescenční sondy jsou tedy nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace. Existuje široké spektrum fluorescenčních sond, které se používají při nejrůznějších druzích výzkumu (zjišťování polarity prostředí, výzkum nukleových kyselin, studium biologických membrán...). [5]

Pro náš experiment jsme vybrali fluorescenční sondu, která je ze skupiny fluorescenčních sond citlivých na přítomnost dvojmocných iontů. Tato sonda se nazývá fura-2 a po navázání na dvojmocný iont vykazuje změny ve svém absorpčním spektru. Ty můžeme pozorovat zkoumáním excitačního spektra v rozmezí vlnových délek 300 - 400 nm a sledováním emise při vlnové délce asi 510 nm. [6]

2.3 Kovy a jejich biologická funkce

Kovové ionty hrají významnou roli v řadě procesů probíhajících v živých organismech. Např. měď a zinek se vyskytují v řadě enzymatických cyklů nezbytných pro správnou funkci životních pochodů a jejich přítomnost v potravě ovlivňuje zdravotní stav organismu. Mangan je důležitým prvkem pro správný metabolismus cukrů a cholesterolu, jeho nadbytek však negativně působí na nervovou soustavu. Dalším prvek, jehož dostatečné množství v organismu je zásadní zvláště v období růstu, je vápník. Ten je zodpovědný za správný vývin a růst kostí a zubů a jeho ukládání do kostní hmoty úzce souvisí s dostatečným množstvím vitamínu D. Přítomnost některých kovů může být ale v organismu nežádoucí. Takovýmto kovem je např. rtuť, olovo, či kadmium, na které zaměřujeme svou pozornost. [7]

Chemicky je kadmium velmi podobné zinku, jež je nezbytnou součástí potravy. Tato vzájemná podobnost ale působí problémy. Kadmium může snadno vstupovat do různých enzymatických reakcí místo zinku a následné biochemické pochody neproběhnou, nebo probíhají jiným způsobem. Kadmium je kumulativní jed, který se z organismu vylučuje jen velmi pozvolna a obtížně. Ukládá se hlavně v ledvinách, které jsou při chronické otravě kadmиеm nejvíce ohroženy. Vyšší obsah kadmia také působí na metabolismus vápníku a způsobuje jeho zvýšené vylučování z organismu a následné zeslabení kostní hmoty. Kadmium je také prokazatelně karcinogenní. [7,8]

2.4 Přenos látek přes lipidovou membránu

Membrána je za normálních okolností velmi málo propustná pro ionty a pro polární látky. Proto existují mechanismy, které umožňují přenos těchto látek přes membránu. Z energetického hlediska můžeme transport rozdělit na aktivní a pasivní. Aktivní transport je proces, který probíhá proti koncentračnímu gradientu dané látky a je zajišťován integrálními membránovými proteiny. Energie potřebná pro tento transport se získává např. umožněním pasivního transportu jedné částice,

přičemž část takto získané energie se využije pro aktivní transport druhé částice. Tohoto mechanismu využívá i symportér MntH, který přenáší protony společně s dvojmocnými ionty. Pasivní transport naopak probíhá po směru koncentračního gradientu a energie se při něm nespotřebovává, ale uvolňuje. Pasivní transport může být realizován třemi způsoby. Volnou difuzí mohou přes membránu pronikat malé molekuly. Dočasnými nebo trvalými póry, které spojují obě hydrofilní části membrány, mohou difundovat látky na základě velikosti a správného náboje. Třetí typ pasivního transportu je označován jako usnadněná difuze, při které částice přecházejí přes membránu pomocí nějaké jiné molekuly, např. pomocí ionoforů. Ionofory jsou látky nebiřkovinné povahy, které zvyšují propustnost biologické membrány pro ionty. Molekuly ionoforů obsahují hydrofilní část, která jim umožňuje vytvořit komplex s iontem, a část hydrofobní, která zajišťuje rozpustnost v lipidové dvojvrstvě. [9 str.47-48, 10 str.237-242, 11]

2.5 Transport Me^{2+} pomocí 4-Br A_{23187} , A_{23187} a ionomycinu

V této práci jsme čerpali inspiraci z výzkumu W. L. Erdahla a kol. [12], kteří studovali transport dvojmocných kovů pomocí ionoforů 4-Br A_{23187} , A_{23187} a ionomycinu. Na tomto místě bychom se tedy chtěli zmínit o tom, jakým způsobem W. L. Erdahl a kol. měření prováděli, jaká získali data a jaké z nich vyvodili výsledky.

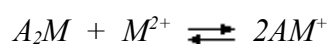
Jako modelový systém použili liposomy z 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerolfosfatidylcholinu (POPC), které naplnili fluorescenční sondou Quin-2. Liposomy připravovali extruzí podobně jako my pouze s rozdílem ve výsledné velikosti liposomů. Zatímco oni použili filtr o velikosti pórů 100 nm, my jsme si vytvořili liposomy o průměru až 400nm. Transport dvojmocných kovů do liposomů obsahujících Quin-2 detekovali spektroskopicky monitorováním formování komplexu Quin-2-kationt. Reakci samotnou spouštěli přidáním ionoforu. Pro ustálení interního a externího pH pak bylo zapotřebí 2-3 min běhu reakce. Formování komplexu fluorescenční sondy s kationtem bylo monitorováno spektroskopicky.

Z výsledků měření vyplývá, že jak A_{23187} tak ionomycin přenášejí dvojmocné ionty při pH 7,00 s touto selektivitou: $Zn^{2+} > Mn^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$. Transportní vlastnosti 4-Br A_{23187} jsou tomuto velmi podobné až na schopnost přenášet Ca^{2+} . Tento kationt je pomocí 4-Br A_{23187} přenášen velmi pomalu srovnáme-li rychlost transportu Ca^{2+} se zbylými dvěma ionofory. Z tohoto vyplývá, že 4-Br A_{23187} se může stát užitečným nástrojem k ovlivňování množství Zn^{2+} a Mn^{2+} v buňkách bez znatelného zásahu do regulačních mechanismů zodpovědných za množství Ca^{2+} v buňce.

Pro Zn^{2+} , Mn^{2+} a Ca^{2+} pak prováděli další měření zaměřená na to, jak transport přes membránu jednotlivými ionofory souvisí pro tyto kovy s jejich koncentrací a pH. Jak v závislosti na pH tak i v závislosti na koncentraci iontů se objevuje různorodé chování. Stručně můžeme říci, že závislost rychlosti transportu na pH pro ionofor A_{23187} se podobá tomu pro 4-Br A_{23187} až na případ Ca^{2+} . Transport Ca^{2+} pomocí 4-Br A_{23187} je na pH nezávislý, pro A_{23187} rychlost přenosu s rostoucím pH stoupá. Pomocí ionomycinu jsou všechny tři kovy přenášeny rychleji se zvyšujícím se pH.

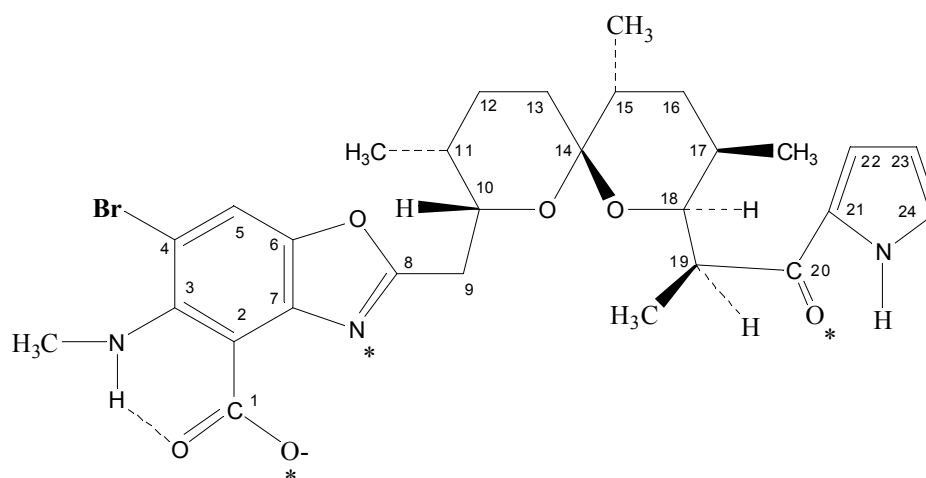
Z výsledků svých měření pak odvozují v jakých poměrech ionofor-kationt jsou kovy pomocí ionoforů přenášeny. Získaná data naznačují, že na rozdíl od ionoforů A_{23187} a 4-Br A_{23187} ionofor ionomycin přenáší všechny tři kovy prakticky jen ve formě 1:1 komplexů.

Ukazuje se, že 4-Br A_{23187} vykazuje nízkou aktivitu jako Ca^{2+} ionofor při zachování své aktivity pro jiné kovy. Je možné, že bromace A_{23187} na pozici 4 může snižovat stabilitu komplexu ionoforu s vápníkem v poměru 2:1, zatímco nemá vliv na snížení stability analogických komplexů, které mohou transportovat jiné kovy. Pokud máme v roztoku kov ve výrazném nadbytku dochází k této reakci



a tudíž je komplex 1:1 a 2:1 v jistém poměru. Takto tvořené 1:1 komplexy jsou náchylné k interakci s OH^- , čímž se formuje neutrální komplex $AM \cdot OH$. Tímto vzniká potenciál pro A_{23187} a 4-Br A_{23187} transportovat dvojmocné ionty jako 1:1 komplexy buďto elektroneutrální ($AM \cdot OH$) nebo jako komplexy elektricky nabitě (AM^+). Těmito ionofory není Ca^{2+} přenášen jako elektricky nabitý komplex. A zdá se, že elektricky neutrální komplex $AM \cdot OH$ se podílí na přenosu Ca^{2+} jen

velmi málo. Teorie proč tomu tak je říká že, koordinační číslo Ca^{2+} je 7-9. Zatímco jen tři až čtyři vazby jsou s atomy ionoforu nebo OH^- , zbylé pozice mohou být obsazeny vodou. Tím se snižuje rychlost průchodu obou typů 1:1 komplexů membránou. Zn^{2+} i Mn^{2+} mají nižší koordinační čísla (4-6) takže jejich 1:1 komplexy s A_{23187} a 4-Br A_{23187} jsou méně náchylné k hydrataci a tím pádem mohou snadněji prostupovat membránou. Zn^{2+} a Mn^{2+} jsou tedy přenášeny jako 1:1 a 2:1 komplexy. Ca^{2+} je přenášen zejména komplexem 2:1. Pokud je stabilita komplexu 2:1 oslabena bromací A_{23187} na pozici 4 (obr.1), dochází ke snížení aktivity transportu tohoto iontu.



Obrázek č. 1: Struktura 4-BrA₂₃₁₈₇ ukazuje číslování uhlíků v molekule. Hvězdičkou jsou označeny atomy, na které se váže kationt kovu.

V dostupné literatuře jsou údaje o transportu Cd^{2+} pomocí aspoň jednoho z námi vybraných ionoforů skromné. Jediná zmínka o Cd^{2+} v tomto kontextu je pouze v článku W. L. Erdahla a kol. [13]. Tento článek se zabývá transportem jiného toxického prvku Pb^{2+} pomocí ionomycinu a A_{23187} . V úvodu je však zmínka o tom, že studie na liposomech ukázaly tokovouto selektivitu transportu pro ionomycin : $\text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$. Z grafu časové závislosti transportu kovových iontů pomocí A_{23187} pak vyplývá, že tímto ionoforem je Cd^{2+} přenášeno za daných podmínek velmi podobně jako Mn^{2+} . V dostupné literatuře nejsou údaje o přenosu Cd^{2+} pomocí 4-Br A_{23187} . Pro naše experimenty je přitom právě ionofor 4-Br A_{23187} vhodnější, protože nevykazuje vlastní fluorescenci narozdíl od nebromovaného A_{23187} a je tedy vhodným ionoforem pro použití s fluorescenční sondou fura-2.

Kapitola 3

Materiál a metody

3.1 Fluorescenční měření

Měření jsme prováděli pomocí fluorometru Fluoromax-2. Hlavní části tohoto fluorometru jsou zdroj světla (xenonová výbojka), prostor pro umístění kyvety se zorkem a detektor v podobě fotonásobiče, pracující na principu počítání fotonů. Ke změně excitační a emisní vlnové délky slouží excitační a emisní mřížkový monochromátor.

3.2 Použité roztoky

Pro všechna měření jsme používali jeden pufr o pH 7,49 a to 10 mM PIPES se 100 mM NaCl. Jednotlivé použité kovy byly ve formě chloridových solí a jejich zásobní roztoky byly 100 mM. Jako rozpouštědlo pro ně byla použita voda stejně jako pro 1 mM zásobní roztok fura-2. Ionomycin, A₂₃₁₈₇ i 4-Br A₂₃₁₈₇ byly rozpuštěny v ethanolu a jejich zásobní roztoky byly 1 mM.

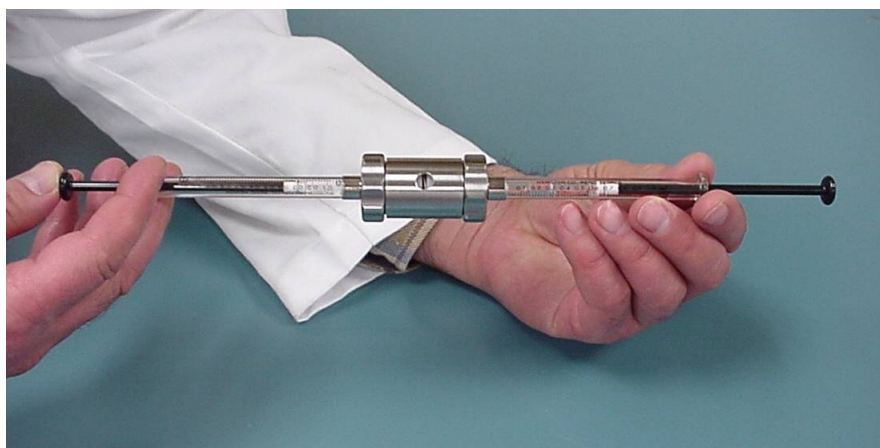
3.3 Příprava liposomů

Na přípravu liposomů byl použit L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol a L- α -Phosphatidylcholin v poměru 1:9 rozpuštěné v chloroformu. Postupovalo se dle [14]. Roztok byl dán do kádinky s kulatým dnem, pomocí N₂ byl odpařen všechen chloroform, čímž se vytvořil na stěnách kádinky tenký film. Kádinku byla pečlivě uzavřena a obalena alobalem, aby bylo zamezeno působení světla, a uložena na několik hodin do vývěvy. Po vyjmutí z vývěvy mohl být vzorek skladován až

24 hodin v ledničce, vakuum vydrží.

Dále byl k lipidům se přidán roztok 10 μM fura-2 v pufru tak, že vzniklý roztok obsahoval 10 mg lipidů na 1 ml. Film na stěnách kádinky se rozpustil za použití sonikátoru. Pomocí N_2 se z kádinky vyfoukal vzduch a kádinka se uzavřela. Následně se provedlo pět cyklů zmražování a rozmražování, aby se z lipidů vytvořili liposomy. Ke zmražování se používal tekutý dusík a vždy se počkalo, až všechny roztok v kádince přejde do pevného stavu. K rozmražování se používala teplá vodní lázeň a opět se čekalo, až bude úplně všechny obsah kádinky tekutý.

Dalším krokem přípravy liposomů byla filtrace. Filtrační aparatura (LiposoFast, Avestin Inc., Ottawa, CA) se skládala ze dvou stříkaček mezi nimiž byl vložen polykarbonátový filtr o definované pórů 400 nm. Nejprve se filtrační aparaturou protlačil pouze pufr, aby se namočil polykarbonátový filtr. Roztok lipidů se filtroval devatenáctkrát tak, aby vzorek skončil v jiné stříkačce, než ve které začal.



Obr. č. 2: Aparatura pro filtraci liposomů na definovanou velikost.

Gelovou filtrací se roztok lipidů čistil od fura-2, která nebyla uzavřena v liposomech. Sephadex G25 se rozpustil v pufru a stočil v centrifuze, tím se vytvořil filtr v podobě sephadexového gelu. Přes tento filtr se pak v centrifuze nechal projít roztok liposomů. Centrifugaci jsme prováděli po dobu 3 minuty, při 2000 otáčkách za minutu a teplotě 4°C.

Kapitola 4

Výsledky a diskuse

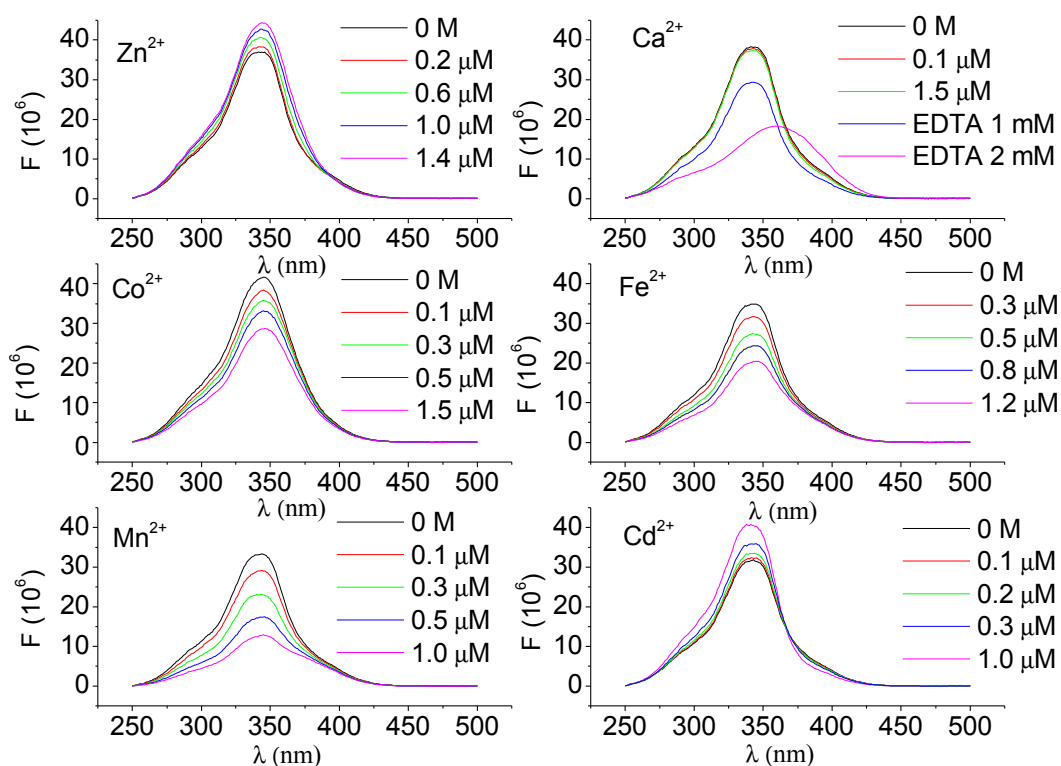
4.1 Spektra fura-2 v přítomnosti Me^{2+}

Abychom získali představu o tom, jak vypadají fluorescenční spektra fura-2 s jednotlivými kovy, prováděli jsme měření nejprve bez lipidů. Byl připraven 1 μM roztok fura-2 v pufru a byl titrován těmito ionty: Ca^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} . Na základě těchto měření jsme chtěli zjistit přibližný rozsah koncentrací Me^{2+} , ve kterém fura-2 na ionty reaguje. Zajímalo nás také typ odezvy jednotlivých kovových iontů.

Při titraci Ca^{2+} bylo zjištěno, že nedochází ke změně intenzity spektra (Graf č.1) a zdálo se, že roztok je v saturaci. Proto byl do roztoku přidán EDTA a opravdu se ukázalo, že pufr je kontaminován nezanedbatelným množstvím vápníku. Tato kontaminace může způsobovat menší citlivost i na ostatní dvojmocné ionty, ale jak je vidět z výsledků měření (Graf č.1) spektra ostatních kovů na titraci narozdíl od Ca^{2+} reagovala. V případě Zn^{2+} , Cd^{2+} a Co^{2+} spíše méně, ale pro Mn^{2+} a Fe^{2+} relativně silně. I přes tuto kontaminaci je tedy možno s ostatními kovy provést měření, ale pro další experimenty by možná bylo vhodné použít pufr s nižším obsahem kovových iontů.

Fluorescenční spektra fura-2 s ionty kovů můžeme rozdělit do dvou kategorií. Z kovů, které jsme měřili, patří do té první Co^{2+} , Fe^{2+} a Mn^{2+} . Tato skupina se vyznačuje tím že při zvyšování koncentrace kovu se fluorescence zháší prakticky rovnoměrně v celém spektru. Druhou kategorií tvoří Ca^{2+} , Cd^{2+} a Zn^{2+} . Zvyšování koncentrace těchto kovů má za následek posuv spektrálního maxima směrem k nižším vlnovým délkám a současné rozsvěcení fluorescence. Nejlépe je tento efekt vidět právě u Ca^{2+} s EDTA.

Z rozdělení kovů do těchto dvou kategorií plyne způsob, jakým byl sledován časový vývoj fluorescence jejich vzorků. Při studiu fluorescence fura-2 s první skupinou byl sledován vývoj spektra na vlnové délce 340nm, kde se přibližně nachází maxima těchto spekter a změna intenzity je zde tedy nejvýraznější. Pro druhou skupinu, kterou nakonec v našich měřeních reprezentuje jen Cd^{2+} , jsme zvolili sledování poměru intenzit fluorescence na dvou vlnových délkách, odpovídajících dvěma extrémům spektrálního maxima (340nm/380nm).

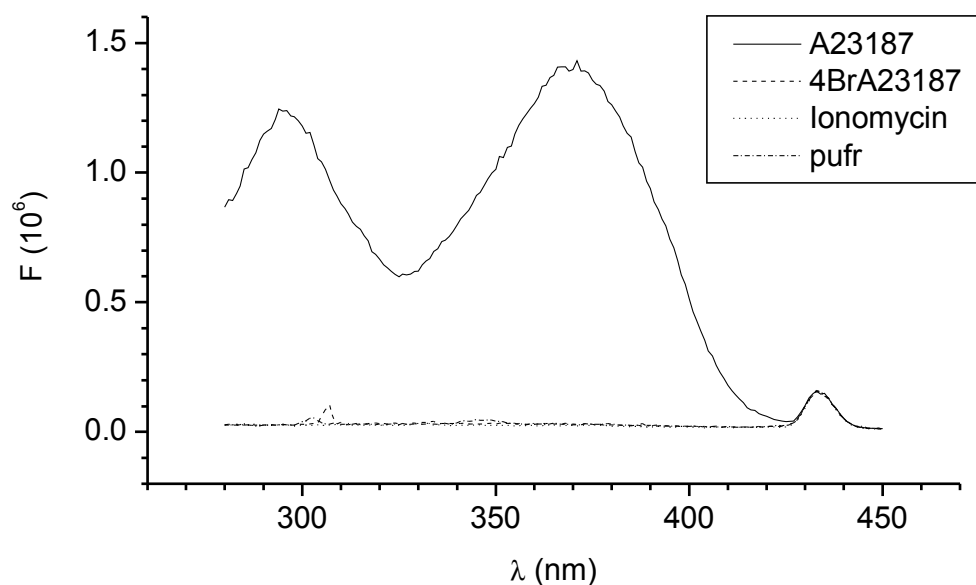


Graf č.1: Spektra fura-2 v přítomnosti dvojmocných kovů v pufru. V legendě je uvedena koncentrace příslušného kovu ve vzorku.

4.2 Ionofor A₂₃₁₈₇

Naším původním záměrem bylo otestovat transport dvojmocných kovů přes lipidovou membránu pomocí tří ionoforů. A to pomocí ionomycinu, A₂₃₁₈₇ a jeho bromované verze 4-Br A₂₃₁₈₇. O ionoforu A₂₃₁₈₇ se ví, že vykazuje vlastní fluorescence [15]. To bylo měřením ověřeno a bylo zjištěno, že tato fluorescence je ve stejné oblasti vlnových délek a stejného řádu a jako fluorescence fluorescenční sondy fura-2. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli další měření provádět jen pomocí ionomycinu a 4-Br A₂₃₁₈₇, u kterých bylo ověřeno, že v oblasti vlnových délek kde měříme, žádnou výraznou vlastní fluorescence nemají (Graf č.2).

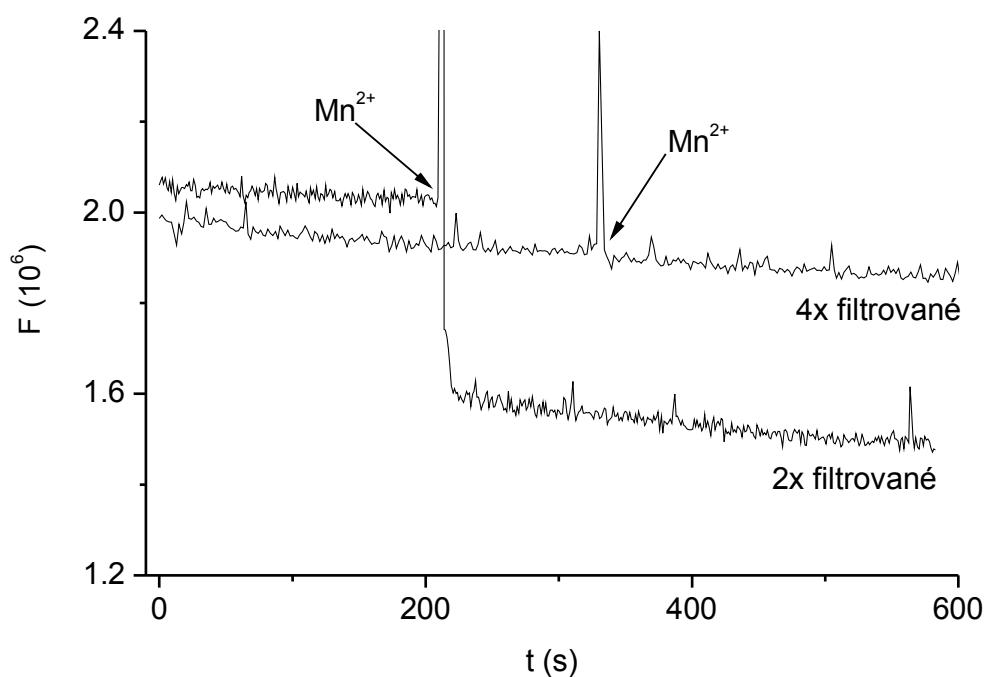
Při realizaci našeho měření jsme se nakonec rozhodli zkoumat průchod přes lipidovou membránu pomocí ionoforů 4-Br A₂₃₁₈₇ a ionomycinu pro tyto tři kovy: Cd²⁺, Co²⁺ a Mn²⁺.



Graf č.2: Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce pro pufr, 1 μM A₂₃₁₈₇, 1 μM 4-Br A₂₃₁₈₇ a 1 μM ionomycin.

4.3 Gelová filtrace liposomů

Liposomy připravené extruzí, tak jak je to popsáno v části kapitoly 3.1, byly čištěny gelovou filtrací, aby se odstranila fura-2 neuzavřená v liposomech. V prvních experimentech byla tato filtrace provedena pouze dvakrát. Po přidání kovu k roztoku liposomů (bez přítomnosti ionoforu) však docházelo k výraznému skoku v intenzitě fluorescence. (Graf č.3) Což ukazovalo na to, že se fluorescenční sonda nacházela i vně liposomů v nezanedbatelném množství. Teoreticky by totiž přidání kovu k roztoku liposomů, kde je fura-2 pouze uvnitř liposomů, nemělo mít na intenzitu fluorescence vliv a ke změně intenzity fluorescence by mělo dojít až po přidání ionoforu. Z tohoto důvodu jsme zkusili provést místo dvou filtrací čtyři.



Graf č.3: Srovnání změny v intenzitě fluorescence po přidání kovu pro dva vzorky. Oba vzorky na počátku obsahují lipidy v koncentraci 10 mg/ml, v jednom vzorku jsou však lipidy filtrované přes Sephadex G25 pouze dvakrát, ve druhém vzorku čtyřikrát. Během měření jsme do obou vzorků přidali 100 μ M Mn^{2+} .

Po čtyřnásobné filtraci bylo dosaženo podstatného zlepšení. Po přidání kovu do roztoku lipidů již nedocházelo prakticky k žádné změně intenzity fluorescence. (Graf č.3) Zvýšením počtu filtrací bylo tedy objektivně dosaženo toho, že fluorescenční sonda fura-2 je v roztoku přítomna prakticky pouze uvnitř liposomů. Pro další měření byl proto roztok lipidů filtrován čtyřikrát.

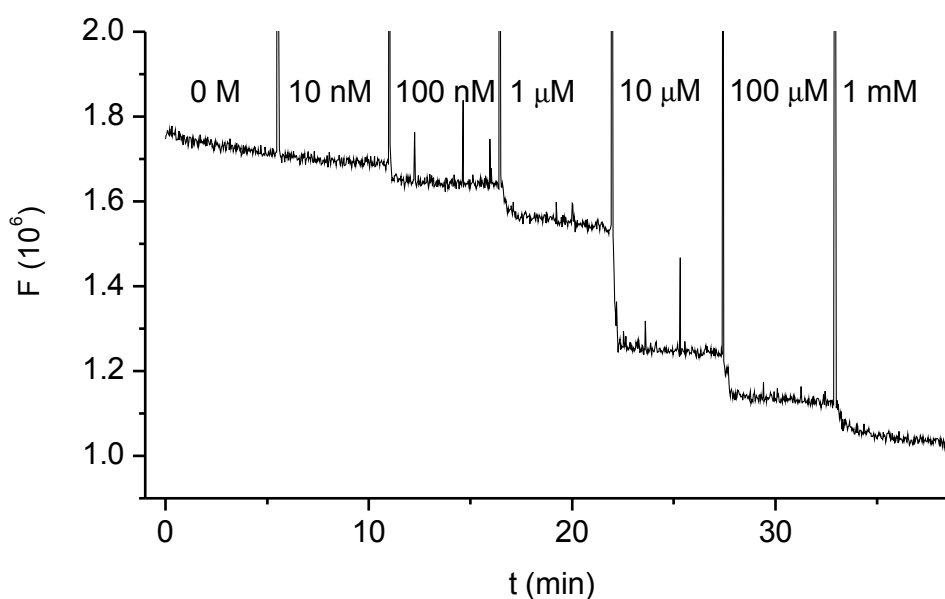
Tuto filtraci bylo třeba provádět před každou sérií měření zvlášť, protože nebyla jistota, že fura-2 z liposomů samovolně nevytéká. Porovnávala se měření s různou časovou prodlevou od přípravy liposomů, tedy od uzavření fura-2 do liposomů. Z první přípravy liposomů jsme prováděli ve třech po sobě jdoucích dnech tři série měření, přičemž každá série měření začínala gelovou filtrací. Porovnání intenzity fluorescence roztoku liposomů po filtraci z první a druhé série nevykazuje žádný rozdíl a zdá se, že fura-2 z liposomů ani po asi 30 hodinách výrazně nevytéká. Při porovnání intenzit z druhé a třetí série byl však zjištěn pokles intenzity o 30%. Tento pokles se dá vysvětlit tím, že časem (po 48 hodinách) fura-2 z liposomů samovolně vytéká a je při filtraci ze vzorku odmyta. To způsobí, že ve vzorku je celkově méně fura-2 a sníží se intenzita fluorescence. Tento efekt nebyl ověřen dalším měřením.

4.4 Kalibrace

K tomu abychom mohli kvantitativně zkoumat kinetiku průchodu dvojmocných kovů do liposomů, je potřeba znát závislost procentuální změny intenzity fluorescence na množství kovu ve vzorku.

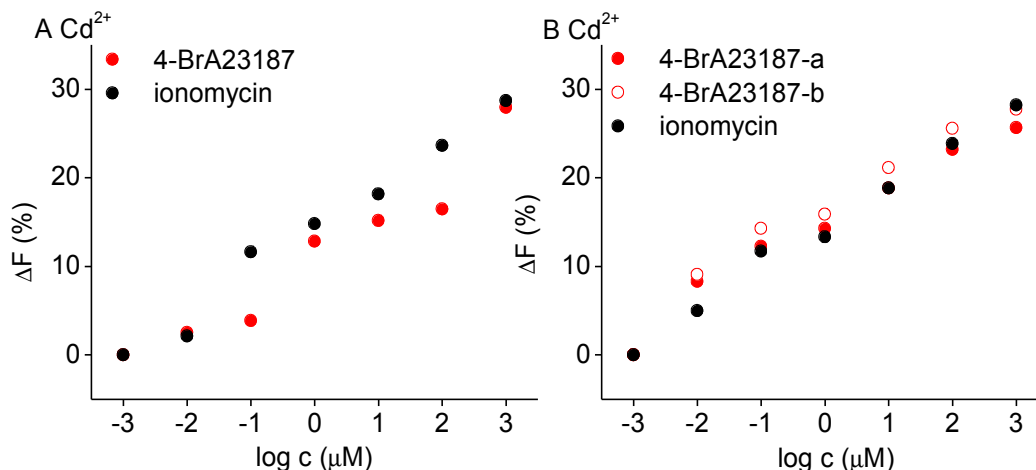
Připravili jsme roztok liposomů (naplněných fura-2, s odfiltrovanou vnější fura-2) v pufru v koncentraci 10 mg/ml a ionoforu v koncentraci 1 μ M. Takovýto roztok jsme nechali promíchat a ustálit a pak jsme jej titrovali kovem tak, že jsme postupně o řád zvyšovali koncentraci kovu. Začali jsme u 10 nM a končili u 1 mM, což je o řád vyšší koncentrace, než používáme při studiu kinetiky průchodu kovů do liposomů.

Kalibrace byla nakonec měřena dvakrát, protože při zpracování výsledků z prvního měření jsme zjistili, že jsme při titraci postupovali příliš rychle a zvyšovali koncentraci ve vzorku v době, kdy ještě nabyla ustálená intenzita fluorescence pro předchozí koncentraci. To vnášelo do určení nějaké kalibrační křivky takovou nejistotu, že jsme se rozhodli měření zopakovat s podstatně delšími časy pro ustálení intenzity fluorescence. Zatímco v prvním měření A jsme na ustálení každé koncentrace čekali maximálně 3 minuty, při opakovaném měření B jsme čekali po dobu 5 - 7 min (Graf č.4).

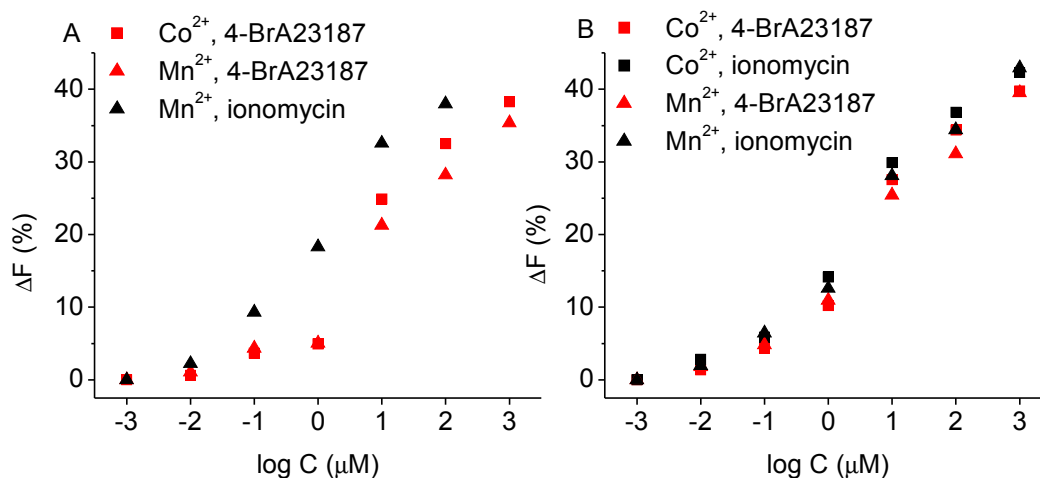


Graf č.4: Roztok 10mg/ml liposomů, 1 μM 4-Br A_{23187} v pufru. V roztoku se s časem mění koncentrace Co^{2+} , tak jak je popsáno v grafu.

Kalibrační křivky závislosti intenzity fluorescence na čase jsme vyhodnotili a přepočítali je na závislosti procentuální změny intenzity fluorescence na koncentraci kovu. Při prvním měření A docházelo k rozptylu bodů této závislosti pro jeden kov a dva ionofory. Při korektnějším měření B jsme dosáhli dobré shody této závislosti při různých ionoforech pro Cd^{2+} (Graf č.5). Pro Mn^{2+} a Co^{2+} se shodují nejen každý tento kov s ionomycinem a 4-Br A_{23187} , ale shodují se i závislosti těchto dvou kovů navzájem (Graf č.6).



Graf č.5: Závislost procentuální změny intenzity fluorescence na koncentraci Cd²⁺. Vlevo měření A s nedostatečnou časovou prodlevou, vpravo měření B s delšími časy pro ustálení fluorescence při jednotlivých koncentracích Cd²⁺ tak jak je popsáno v textu výše. Transport Cd²⁺ pomocí 4-Br A₂₃₁₈₇ byl měřen pro kontrolu dvakrát, takže v grafu jsou měření rozlišena jako “a” a “b”.

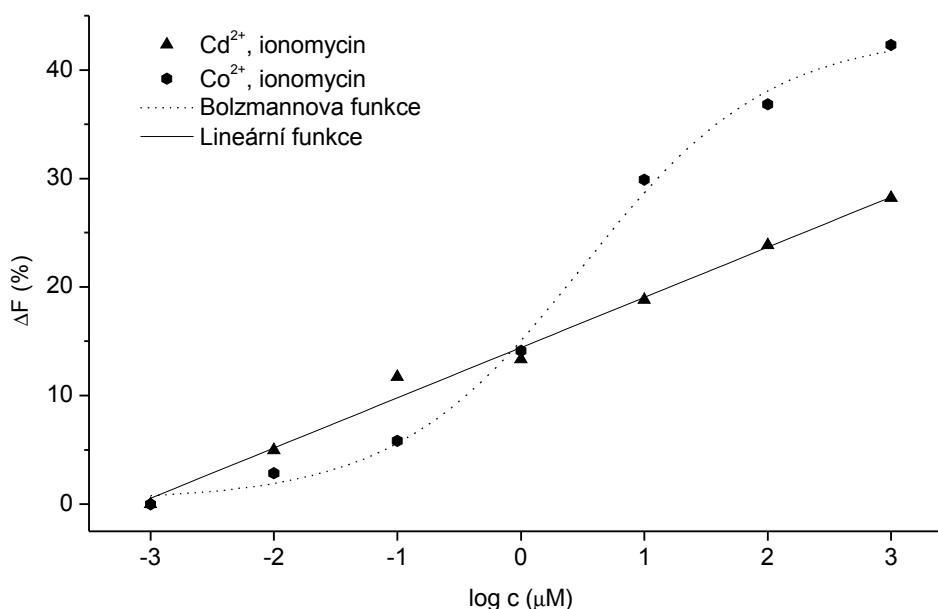


Graf č.6: Závislost procentuální změny intenzity fluorescence na koncentraci Co²⁺ a Mn²⁺. Označení A, B obdobně jako u grafu č.5.

Procentuální změny intenzity fluorescence na koncentraci kovu vykazovali dva typy závislostí. Lineární pro Cd^{2+} a nelineární pro Mn^{2+} a Co^{2+} , která se vyznačuje pomalejším růstem při nižších koncentracích, prudší změnou fluorescence při přechodu z 1 μM na 10 μM , což je následováno opět pomalejším růstem při vyšších koncentracích. Tuto nelineární závislost jsme proložili Boltzmannovou funkcí (1), která dobře kopíruje popsany trend závislosti.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (1)$$

Zdá se, že tvar kalibračních křivek (Graf č.7) souvisí s kategorií, do které spadá fluorescenční odezva fura-2 na daný kovový iont, a není závislý na použitém ionoforu. Cd^{2+} patří do kategorie kovů, které způsobují posuv fluorescenčního maxima, narozdíl od Co^{2+} a Mn^{2+} , které fluorescence zhasí. Zároveň jsme každou kategorii sledovali jiným způsobem. To se neprojevilo ani tak ve tvaru křivky, ale spíše v hodnotě změny intenzity fluorescence ΔF . Při sledování intenzity fluorescence na vlnové délce 340 nm (Mn^{2+} a Co^{2+}) byly získána změna této intenzity ΔF až 43%. Při sledování poměru intenzity fluorescence na 340 nm ku intenzitě na 380 nm (Cd^{2+}) byla pozorována změna v tomto poměru pouze 29%. To je také příčinou větší disperze při měření Cd^{2+} (Graf č.8-B).



Graf č.7: Příklady proložených závislostí procentuální změny intenzity fluorescence na koncentraci kovů.

Z měření kalibrací také vyplynulo, že dostatečná časová prodleva při titraci kovem je důležitá zvláště pro nízké koncentrace. Srovnáme-li u grafů č.5 a č.6 části A (s kratšími intervaly titrace) a B (s delšími intervaly titrace), zjistíme, že body z částí A se s body z částí B rozcházejí právě při nižších koncentracích a také více pro 4-Br A₂₃₁₈₇ než pro ionomycin. Z toho lze usoudit, že transport pomocí ionomycinu je rychlejší a to i při nižších koncentracích kovu.

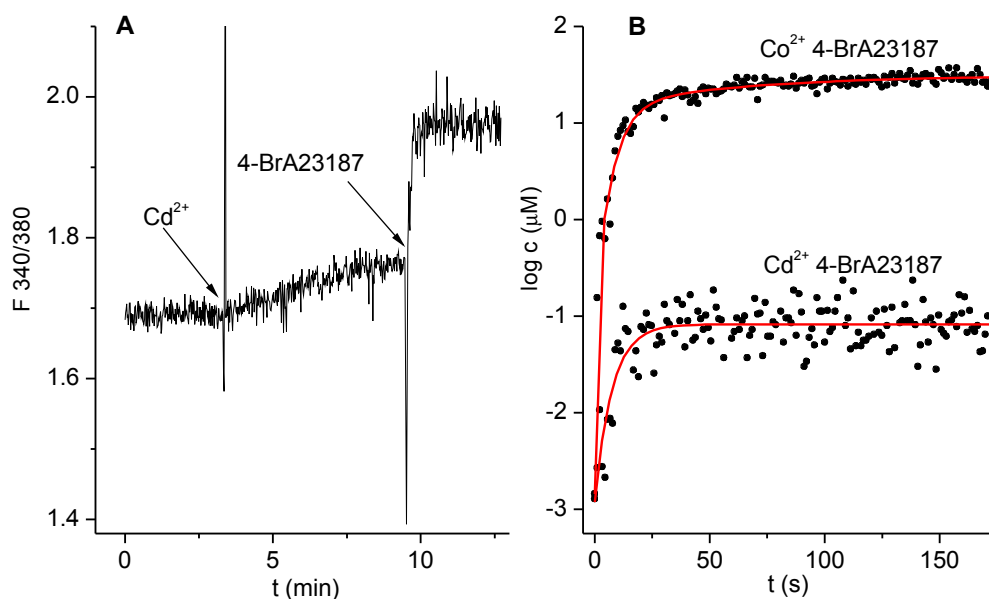
Takto získané kalibrační křivky byly použity k vyhodnocení výsledků měření kinetiky transportu kovových iontů do liposomů.

4.5 Kinetika transportu

Další měření probíhalo podobně jako měření kalibrací. Na začátku byl připraven roztok lipidů (10mg/ml) v pufru. V tomto roztoku byla sledována závislost intenzity fluorescence na čase a postupně do něj byly přidávány nejdříve dvojmocné ionty v koncentraci 100 μM a poté ionofor v koncentraci 1 μM.

Po přidání dvojmocných iontů jsme několik minut čekali, než jsme přidali do vzorku ionofor a tím nastartovali reakci, která nás nejvíce zajímá. Tato časová prodleva před přidáním ionoforu měla zajistit ustálení fluorescence po případné interakci vnější fura-2 s kovovými ionty. Přidání ionoforu mělo ve všech případech (pro všechny kovy i ionofory) očekávaný okamžitý účinek na změnu intenzity fluorescence (Graf č. 8-A). Odlišný způsob vyhodnocování měření pro Co²⁺ a Mn²⁺ (zde jsme sledovali intenzitu fluorescence na 340 nm) a pro Cd²⁺ (zde jsme sledovali poměr intenzity fluorescence 340/380 nm) vedl k tomu, že pro Cd²⁺ jsme získali po přepočítání dle příslušné kalibrace větší rozptyl experimentálních bodů jak je patrné z Grafu č.8-B.

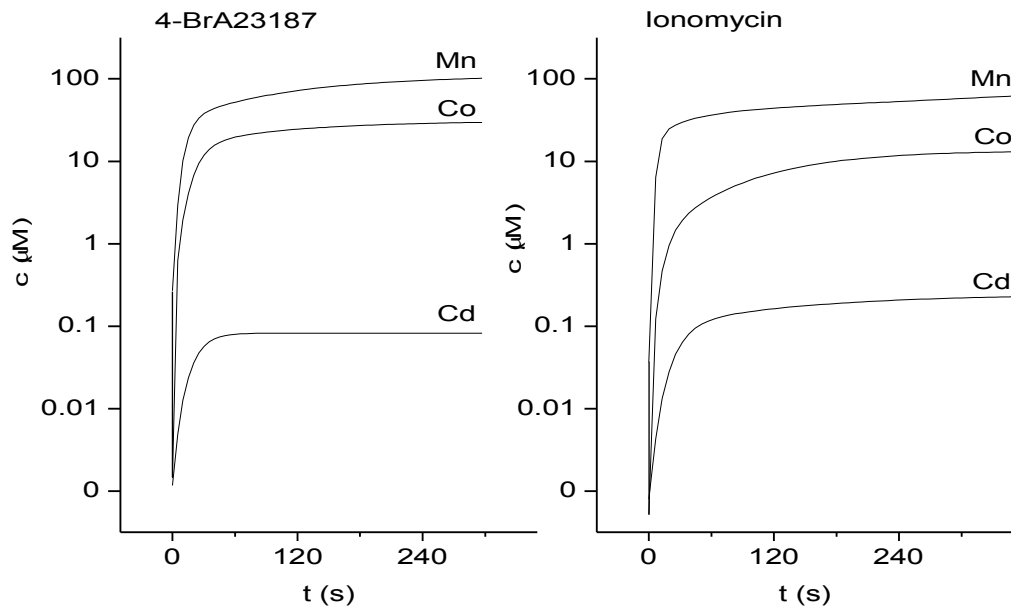
Takto naměřená křivka byla převedena na procentuální změny fluorescence. Poté byla pomocí kalibrace příslušné danému kovu a danému ionoforu přepočítána na procentuální změny fluorescence na koncentraci dvojmocných iontů. Tímto byla získána časová závislost transportu kovů do liposomů (Graf č.9).



Graf č.8-A: Záznam z měření kinetiky transportu Cd^{2+} pomocí 4-Br A_{23187} . Přidání $100 \mu\text{M}$ Cd^{2+} i $1 \mu\text{M}$ 4-Br A_{23187} je v grafu označeno.

Graf č.8-B: Proložení závislosti transportu Co^{2+} a Cd^{2+} pomocí ionoforu 4-Br A_{23187} na čase.

Na transportní křivku Mn^{2+} pomocí 4-Br A_{23187} je třeba pohlížet s jistou rezervou. Kalibrace tohoto transportu byla totiž měřena v jiné sérii měření než samotná kinetika a při aplikaci této kalibrace došlo k tomu, že se transportní křivka překročila maximální koncentraci iontu. Maximální koncentrací je myšlena hodnota koncentrace kovového iontu, která byla do roztoku přidána a tudíž víme, že ani po transportu do liposomů nemůže být vyšší. Proto jsme transportní křivku Mn^{2+} pomocí 4-Br A_{23187} znormovali tak aby dosáhla, ale nepřekročila, maximální koncentrace. Z tohoto také plyne jisté poučení pro případná další měření. Měření z různých sérií (po různých počátečních čtyřnásobných gelových filtracích) nejsou navzájem reprodukovatelná, a proto je třeba kinetiku i kalibraci pro daný kovový iont a daný ionofor měřit vždy v rámci jedné série.



Graf č.9: Časový vývoj transportu dvojmocných iontů přes lipidovou membránu pomocí 4-Br A₂₃₁₈₇ a ionomycinu. Koncentrace na ose y udává změnu koncentrace Me²⁺ uvnitř liposomů. Použili jsme pufr o pH 7,49; lipidy v koncentraci 10mg/ml a všechny dvojmocné kovy v koncentraci 100 μM. Transport byl vyvolán přidáním 1 μM 4-Br A₂₃₁₈₇ nebo 1 μM ionomycinu.

Graf č.9 ukazuje vývoj křivek pro transport několika dvojmocných iontů do liposomů pomocí dvou různých ionoforů. Z grafu č.9 jasně vyplývá, že pro 4-Br A₂₃₁₈₇ i ionomycin dostáváme stejnou selektivitu přenosu a to: Mn²⁺ > Co²⁺ > Cd²⁺, za podmínek měření. Zdá se, že přenos oběma ionofory je velmi podobný, ale např. pro Mn²⁺ vykazuje rychlejší počáteční transport ionomycin narozdíl od Co²⁺, kde je tomu naopak. U Cd²⁺ jsme zaznamenali nepatrně rychlejší počáteční transport pomocí 4-Br A₂₃₁₈₇.

Víme, že transportní křivky jednotlivých kovů jsou velmi významně závislé na pH a dalších parametrech měření. Různí se jak pro jednotlivé ionofory tak i různé kovy [12, 16]. Za podmínek našeho měření jsme zjistili, že Cd²⁺ je pomocí ionomycinu i 4-Br A₂₃₁₈₇ přenášeno. Tento přenos je však podstatně slabší a pomalejší, než přenos dalších testovaných kovů Mn²⁺ a Co²⁺.

Kapitola 5

Závěr

V této bakalářské práci jsme pomocí fluorescenční spektroskopie studovali propustnost lipidové membrány pro dvojmocné kovové ionty. Jako modelový systém byly extruzí připraveny liposomy, do kterých byla uzavřena fluorescenční sonda fura-2. Od fura-2, která se neuzavřela do liposomů, byl roztok čištěn gelovou filtrací. Bylo zjištěno, že pro dostatečné odmytí fura-2 je zapotřebí vícenásobné aplikace této metody (kap. 4.3). Zdá se, že systém liposomů s fura-2 je stabilní minimálně po 30 hod, než začne fura-2 z liposomů samovolně vytékat.

Membránový transport pomocí 4-Br A₂₃₁₈₇ a ionomycinu byl otestován pro tyto tři kovové ionty: Cd²⁺, Co²⁺ a Mn²⁺. Membránový transport pomocí A₂₃₁₈₇ testován nebyl, protože bylo zjištěno, že vlastní fluorescence tohoto ionoforu je příliš silná pro použití s fura-2 (Graf č. 2)[15]. Byla provedena kalibrace intenzity fluorescence fura-2 v liposomech v závislosti na koncentraci kovového iontu (Graf č.5, č.6). Z opakovaných měření vyplynulo, že pro korektní kalibraci je třeba titraci kovovým iontem provádět s dostatečnými časovými intervaly minimálně 5 min. Takováto doba se zdá dostatečná pro ustálení intenzity fluorescence i pro nízké koncentrace kovových iontů. Měření kalibrací dále ukázalo, že zvláště v oblasti nižších koncentrací transportuje ionomycin kovové ionty rychleji než 4-Br A₂₃₁₈₇. Potvrdilo se, že tvar kalibrační křivky je závislý na charakteru fluorescenční odezvy fura-2 s daným kovem a nezávislý na použitém ionoforu.

Byla naměřena kinetika membránového transportu Cd²⁺, Co²⁺ a Mn²⁺ pomocí 4-Br A₂₃₁₈₇ a ionomycinu. Pomocí příslušných kalibrací byla určena koncentrace kovových iontů v liposomech v závislosti na čase (Graf č.9). Podařilo se ukázat, že Cd²⁺ je pomocí 4-Br A₂₃₁₈₇ transportováno a pro oba ionofory byla získána stejná selektivita transportu: Mn²⁺ > Co²⁺ > Cd²⁺. Literatura [13] udává pro ionomycin takovouto selektivitu transportu: Cd²⁺ > Mn²⁺ > Co²⁺. To, že se pozice Cd²⁺ v těchto posloupnostech neshodují, je možno vysvětlit odlišnými experimentálními podmínkami. Je známo, že selektivita jednotlivých kovů je na experimentálních podmínkách vysoce závislá [12, 13, 16].

Literatura

- [1] Prosser V. a kol. (1989): Experimentální metody biofyziky. Akademia, Praha.
- [2] Harvey D. (2000): Modern Analytical Chemistry. DePauw University.
- [3] <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence> (obsah z 5/2007)
- [4] <http://www.pti-nj.com/fluorescence.html> (obsah z 5/2007)
- [5] <http://www1.lfl.cuni.cz/%7Ezfsar/fluorescence/Default.htm>
(obsah z 5/2007)
- [6] Haugland, R. P. (2005) The Handbook (A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies), 10th ed. Invitrogen Corp.
- [7] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kov> (obsah z 5/2007)
- [8] <http://en.wikipedia.org/wiki/Cadmium> (obsah z 5/2007)
- [9] Klouda P. (2005): Základy biochemie. Pavel Klouda. Ostrava.
- [10] Kalous V, Zajiček Z. (1980): Biofyzikální chemie. SNTL - Nakladatelství technické literatury. Praha.
- [11] http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/transport_membranovy.html
(obsah z 5/2007)
- [12] Erdahl, W. L., Chapman, C. J., Wang, E., Taylor, R. W., and Pfeiffer, D. R. (1996) Ionophore 4-BrA23187 transports Zn²⁺ and Mn²⁺ with high selectivity over Ca²⁺, *Biochemistry* 35, 13817-13825.
- [13] Erdahl, W. L., Chapman, C. J., Taylor, R. W., and Pfeiffer, D. R. (2000) Ionomycin, a carboxylic acid ionophore, transports Pb(2+) with high selectivity, *J Biol Chem* 275, 7071-7079.
- [14] Liposomes a practical approach, Edited by R.R.C. New, University of Essex
- [15] <http://probes.invitrogen.com/handbook/sections/1908.html> (obsah z 5/2007)
- [16] Erdahl, W. L., Chapman, C. J., Taylor, R. W., and Pfeiffer, D. R. (1995) Effects of pH conditions on Ca²⁺ transport catalyzed by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin suggest problems with common applications of these compounds in biological systems, *Biophys. J* 69, 2350-2363.