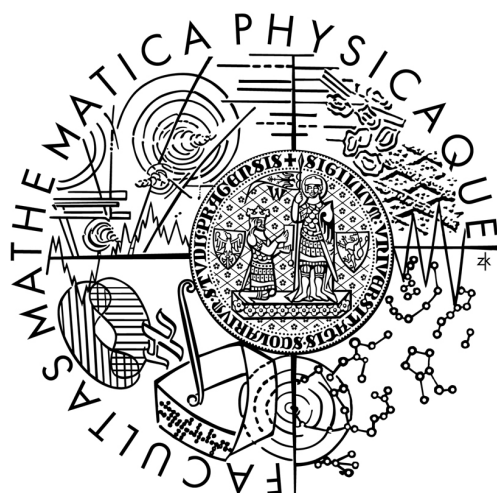


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Jana Nováková

Studium průniku oligonukleotidů skrz liposomální membránu

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Eva Kočišová, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2008

Děkuji RNDr. Evě Kočišové, Ph.D. za obětavé vedení diplomové práce a všestrannou pomoc při její tvorbě. Dále děkuji Doc. RNDr. Petru Mojzešovi, CSc. a Doc. RNDr. Marku Procházkovi, Dr. za cenné rady k experimentální části této práce. RNDr. Vladimíru Kopeckému Jr., Ph.D. děkuji za seznámení s experimentálním zařízením.

Zvláštní poděkování patří Prof. Štěpánkovi za podnětné a cenné rady při zpracování výsledků.

V neposlední řadě děkuji Martinu Křížovi za velkou trpělivost a věnovaný čas.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne: 30. dubna 2008

Jana Nováková

Obsah:

1. ABSTRAKT	5
1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
Nukleové kyseliny	9
Lipidy	11
Biologické membrány.....	11
Liposomy.....	13
Vznik agregátů.....	15
2.3. Antisenzní terapie	17
2.3.1. Idea antisenzní terapie.....	17
2.3.2. Antisenzní oligonukleotidy.....	18
2.3.3. Doprava oligonukleotidů do buňky.....	20
2.4. Měřicí metody	26
2.4.1. Absorpční spektroskopie.....	26
2.4.2. Ramanova spektroskopie.....	27
2.4.3. Konfokální mikroskopie.....	32
3. MOTIVACE	34
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1. Popis aparatury	35
4.1.1. Integrovaný Ramanův systém HR 800.....	35
4.1.2. UV/VIS absorpční spektrometr.....	36
4.2. Použité látky	36
4.3. Příprava vzorků	37
4.3.1. Příprava jednovrstevných liposomů.....	37
4.3.2. Příprava vzorků na podložním sklíčku.....	39
4.3.3. Příprava vzorků oligonukleotidu a porfyriu.....	40
4.4. Zpracování výsledků	41
4.4.1. Faktorová analýza.....	41
4.4.2. Metoda ortogonálních diferencí.....	42

5. EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY	44
5.1. Měření vzorků na podložním sklíčku	44
5.1.1. Liposomy.....	44
5.1.2. Porfyrin CuTMPyP ₄	45
5.2. Měření vzorků DCDR technikou	47
5.2.1. Liposomy.....	48
5.2.2. Komplex oligonukleotidu a porfyriu.....	50
5.2.3. Interakce liposomů s komplexem oligonukleotidu a porfyriu.....	55
6. Závěr	61
7. LITERATURA	63

Název práce: Studium průniku oligonukleotidů skrz liposomální membránu.

Autor: Jana Nováková

Katedra: Oddělení fyziky biomolekul, FÚ UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Eva Kočišová, Ph.D.

e-mail vedoucího: Eva.Kocisova@mff.cuni.cz

Abstrakt: Modifikované oligonukleotidy, krátké úseky nukleové kyseliny, se staly potenciálními léčivy virových, nádorových či geneticky podmíněných onemocnění. Účinné použití modifikovaných oligonukleotidů vyžaduje jejich efektivní průnik skrz buněčnou membránu dovnitř buňky. V diplomové práci byly využívány liposomy, syntetické váčky tvořené dvojistou lipidovou vrstvou, jako modelový systém ke studiu interakce lipidu s komplexem homooligonukleotidu dT₁₅ a kationického porfyrinu CuTMPyP₄ za použití Ramanovy spektroskopie. Měření Ramanových spekter bylo prováděno na integrovaném Ramanově konfokálním mikrospektrofotometru a to jednak z roztoku na podložním sklíčku a jednak za použití speciální techniky kapkově nanášených povlaků (DCDR). Byl optimalizován proces výroby liposomů a přípravy vzorků pro měření spekter. Experimentální data byla zpracována faktorovou analýzou za využití algoritmu SVD (singular value decomposition). Bylo pozorováno, že při interakci oligonukleotidu s porfyrinem dochází k nárůstu signálu způsobeného fluorescencí. V naměřených Ramanových spektrech komplexu oligonukleotidu s porfyrinem dominují pásy, které přísluší vibračním porfyrinu. Ve spektrech komplexu s liposomy je možné pozorovat příspěvek valenčních vibrací vodíků řetězců mastných kyselin lipidu. Pozorované spektrální změny ukazují na interakci lipidu s komplexem oligonukleotidu a kationického porfyrinu.

Klíčová slova: antisenzní terapie, kationický porfyrin, oligonukleotid, liposom, Ramanova spektroskopie

Title: Study of oligonucleotide penetration through liposomal membrane

Author: Jana Nováková

Department: Division of Biomolecular Physics, Institute of Physics, Charles University

Supervisor: RNDr. Eva Kočišová, Ph.D.

Supervisor's e-mail address: Eva.Kocisova@mff.cuni.cz

Abstract: Modified oligonucleotides, short pieces of nucleic acids, have become potential candidates for treatment of viral, malignant or genetic diseases. Efficient application of modified oligonucleotides requires their sufficient penetration inside the cell through the lipid membrane. Diploma thesis employs liposomes, synthetic vesicles formed by the lipid bilayer, as a model system for the study of interaction of lipid and complex of homooligonucleotides dT₁₅ with cationic porphyrin CuTMPyP₄ using Raman spectroscopy. Raman spectra were measured in solution on the slide and using special technique of drop coating deposition Raman spectroscopy (DCDR) on integrated Raman confocal microspectrophotometer. Processes of liposome formation and sample preparation were optimized. Experimental data were analysed using factor analysis based on singular value decomposition (SVD) algorithm. It was observed that interaction of oligonucleotide with porphyrin induces fluorescent background increase. Raman spectra of complex of oligonucleotide with porphyrin exhibit the domination of porphyrin vibrational bands. Stretching vibrations of lipid assigned to hydrogens of fatty acids are observed in the spectra of complex with liposomes. The observed spectral changes show the interaction of lipid with complex of oligonucleotide and cationic porphyrin.

Keywords: antisense therapy, cationic porphyrin, oligonucleotide, liposome, Raman spectroscopy

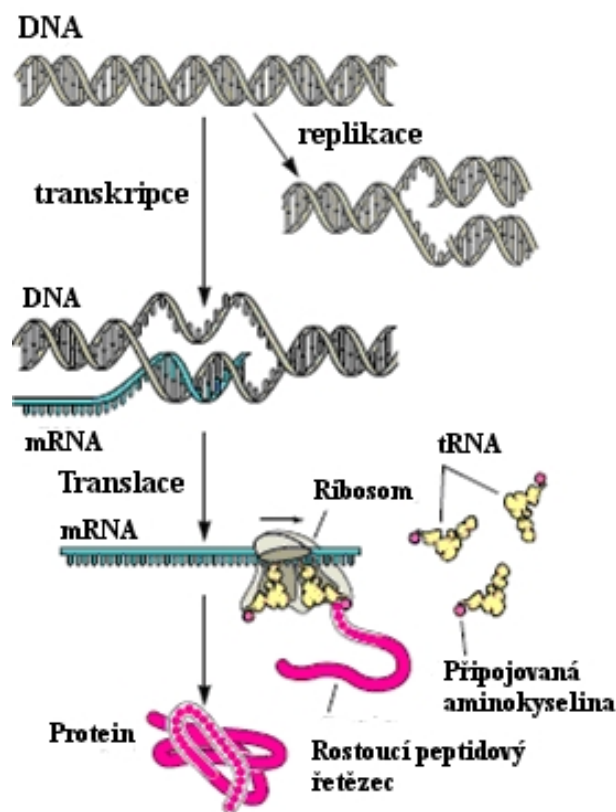
1. Úvod

V současné době je léčba nádorových onemocnění stále velkým problémem moderní medicíny. Nádorová buňka se od normální buňky liší především svou nekontrolovanou schopností dělit se. Buněčný cyklus každé buňky je velmi přesně a citlivě regulovaný proces, přičemž na jeho regulaci se podílí velké množství genů a jejich produktů.

Pojem genu je již známý od 2. pol. 19. století, kdy se dědičností zabýval Johann Gregor Mendel, jež dal základy vzniku klasické genetiky. Ve své době byla jeho práce však téměř ignorována, teprve na počátku 20. století se jeho práce opět staly předmětem zájmu. Došlo k potvrzení Mendelovy hypotézy o dědičnosti, díky níž dochází k přenosu určitých znaků z rodičovské generace na generaci potomků. Roku 1903 Walter Sutton předložil chromosomální teorii dědičnosti, podle níž jsou geny součástí chromosomů. V první polovině 20. století se chromosomy zabýval mimo jiné i Thomas Hunt Morgan. Přinesl řadu nových poznatků o genech a genové vazbě a roku 1933 se stal prvním genetikem, který získal Nobelovu cenu.

Klíčovým okamžikem byl objev a pochopení funkce DNA. Tým amerického vědce Oswalda T. Aweryho roku 1944 prokázal úlohu DNA jako nositelky genetické informace. Další poznatky ohledně komplementarity bází přinesl Erwin Chargaff. Podle jeho teorie má DNA stejný počet adeninových a thyminových zbytků a stejný počet guaninových a cytosinových zbytků. Samotnou strukturu DNA se podařilo určit J. Watsonovi a F. Crickovi na základě Chargraffových pravidel a rentgenové studie DNA pořízené M. Wilkinsem a R. Franklinovou. Roku 1953 zveřejnili dvojšroubovicový model DNA s charakteristickým párováním bází. V roce 1962 získali Watson, Crick a Wilkins za tento objev Nobelovu cenu. V následujících letech se podařilo objasnit proces přenosu genetické informace z DNA do RNA a její přepis do proteinu. Tyto principy jsou dnes známy jako centrální dogma molekulární biologie (obr. 1) [1].

Exprese genu zahrnuje především procesy transkripce a translace. Transkripce je přepis genetické informace z molekuly DNA do molekuly zvané mediátorová RNA (mRNA, z anglického messenger). Většinou se jedná o informaci z jednoho genu sloužící k tvorbě jednoho proteinu, který buňka zrovna potřebuje. Při následné translaci dochází k přenosu informace z mRNA do pořadí aminokyselin vznikajícího proteinu. Translace probíhá za účasti molekul transferové RNA (tRNA) na ribosomech.



Obr. 1: Schematicky znázorněné centrální dogma molekulární biologie [2].

Nežádoucí genetická informace přítomná v organismu se realizuje vznikem nežádoucích proteinů. Může jít o genetickou informaci cizorodých organismů (bakterie, kvasinky, plísně), virů nebo o produkci patogenních proteinů vlastními buňkami. Často bývá složité a finančně náročné nalézt účinnou látku, která by dokázala selektivně inhibovat takto vzniklý protein. Např. antibiotika, bakteriální chemoterapeutika, se zpravidla úspěšně používají proti cizorodým prokaryontním organismům, ale mají řadu vedlejších nepříznivých účinků na vlastní buňky.

V posledních přibližně 25ti letech se objevují nové chemoterapeutické přístupy založené na chemicky modifikovaných jednovláknových oligonukleotidech [3]. V současné době představují jednu z nejvíce studovaných technik pro regulaci genové exprese uvnitř živých buněk. K blokování exprese nežádoucího genu může docházet na mnoha různých úrovních. Na zablokování transkripce je postavena tzv. antigenová strategie, při níž se oligonukleotid naváže přímo na nežádoucí sekvenci DNA a tím zabráni syntéze mRNA. Aptamerová strategie je založena na úpravě funkce proteinu prostřednictvím vazby s oligonukleotidem. Nejvíce prostudovaná a současně nejbližší širšímu klinickému použití je antisenzní strategie, při které se

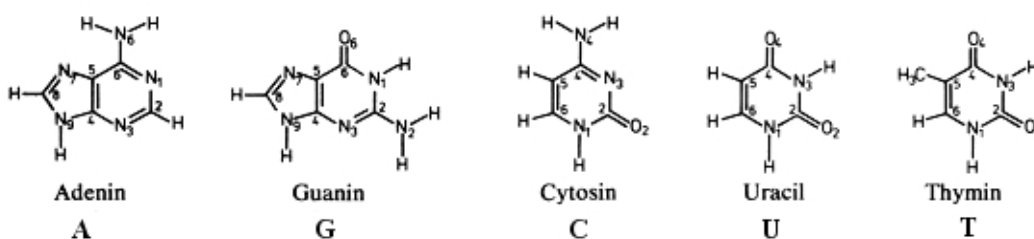
jednořetězcové oligonukleotidy váží ke komplementární sekvenci na molekule mRNA (tzv. senzitivní sekvence, odtud antisenzitivní terapie). Podrobněji je princip této metody popsán v kapitole 2.3. V praxi je ale limitován několika faktory. Jedním z nich je problematika transportu oligonukleotidů do živých buněk. Buněčná membrána představuje pro přirozené oligonukleotidy nepropustnou bariéru, proto jsou vyvíjeny četné podpůrné prostředky stimulující vstup oligonukleotidů do buněk. Interakce oligonukleotidu s buněčnou membránou je nutné studovat na molekulární úrovni. Vhodnou metodou pro toto studium se jeví i Ramanova spektroskopie, která je v rámci vibračních spektroskopických technik výrazně využívána na Oddělení fyziky biomolekul Fyzikálního Ústavu UK. Z tohoto důvodu se ve své diplomové práci zabývám transportem oligonukleotidů a interakcí lipidové membrány s oligonukleotidem a porfyrinem především pomocí technik Ramanovy spektroskopie.

2. Teoretická část

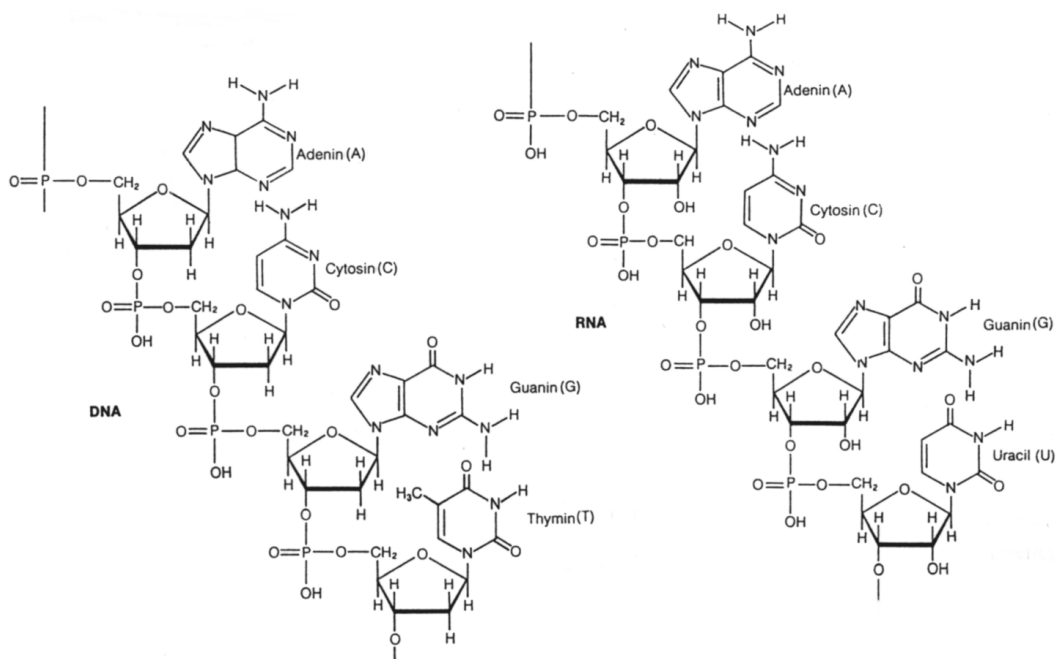
2.1. Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou nositelkami dědičné informace. Jejich základními stavebními jednotkami jsou nukleotidy. Podle počtu nukleotidů mluvíme o mono-, di-, oligo- až polynukleotidech. Nukleotidy se skládají z pětiuhlíkatého cukru (pentózy), zbytku kyseliny fosforečné a dusíkatých bází. Pětiuhlíkatým cukrem je buď zbytek β -D-ribosy (u molekul RNA) nebo zbytek 2'-deoxy- β -D-ribosy (v případě molekul DNA). Pro označení atomů na cukerném zbytku se používá číslování s čárkami, postupně směrem od báze, aby se odlišily od nečárkovaně značených atomů báze [4].

Na cukr se váže esterovou vazbou v pozici 5' zbytek kyseliny fosforečné a v pozici 1' se váže N-glykosidickou vazbou báze. Báze jsou dusíkaté heterocyklické molekuly odvozené od molekuly purinu nebo pyrimidinu. U molekul DNA se běžně vyskytují adenin, thymín, guanin a cytosin. U RNA s místo thymínu vyskytuje uracil. Chemické vzorce jednotlivých bází jsou na obr. 2. V poloze 3' je pak pentóza připojena přes sousední zbytek kyseliny k následující pentóze, čímž vzniká polynukleotidové vlákno (obr. 3).



Obr. 2: Základní báze nukleových kyselin a jejich číslování [4].



Obr. 3: Struktura DNA a RNA [4].

Komplex dvou polynukleotidových vláken vytváří nejčastěji pravotočivou dvojšroubovici, kdy mezi bázemi protějších (antiparalelních) vláken dochází k vazebným interakcím. Spolu se váží vždy jen 2 komplementární baze, vždy jedna baze pyrimidinová a jedna purinová (adenin s thyminem nebo uracilem a cytosin s guaninem). Na vnějším povrchu dvojšroubovice je možné rozeznat dva charakteristické žlábký (malý a velký). V místech žlábků jsou baze vystaveny vnějšímu prostředí a mohou tak interagovat s okolními molekulami.

Prostorová struktura nukleových kyselin je udržována několika stabilizujícími silami. Jednou z nich jsou vodíkové můstky mezi bázemi v jednotlivých vláknech. Vodíkové vazby patří mezi středně silné interakce, ve srovnání s kovalentní vazbou jsou asi 20–30x slabší. Adenin tvoří pár s thyminem nebo uracilem pomocí dvou vodíkových můstků a cytosin se páruje s guaninem pomocí tří vodíkových můstků, proto je tato vazba pevnější. Vytvoření vodíkových vazeb mezi bázemi je podpořeno dalším typem interakce – stohováním neboli stackingem, který je způsoben vertikálním vzájemným působením bazových párů. Jde o interakci mezi π -elektrony aromatických cyklů bazí. Další silou stabilizující strukturu nukleových kyselin je působení kationtů, které redukují elektrostatickou repulzi záporně nabitých

fosfátových skupin cukr-fosfátové kostry šroubovice. Velmi významnou silou stabilizující strukturu dvojšroubovice jsou hydrofobní interakce, kdy do hydrofilního prostředí okolí jsou exponovány nabité fosfáty, zatímco uvnitř dvojšroubovice vzniká hydrofobní prostředí tvořené nepolárními bazemi.

Nejčastější formou komplexu nukleové kyseliny je B-forma DNA. Jedná se o pravotočivou formu charakteristickou kolmým uspořádáním bazí vůči ose dvojšroubovice. Kromě B-formy existují ještě dvě významné formy DNA. První z nich je pravotočivá A-forma, pro kterou je charakteristický vyšší sklon bazových párů k ose dvojšroubovice. Druhou méně častou formou je Z-forma, která je oproti předchozím dvěma formám levotočivá a vyskytuje se v roztocích s vyšší iontovou silou. U jednovláknových syntetických oligonukleotidů není jejich prostorové uspořádání v roztocích přesně definované [4]. Struktura oligonukleotidů závisí silně na pH a liší se jak u ribosových a deoxyribosových nukleotidů, tak i u jednotlivých typů bazí. Podle rentgenové studie poly (dT) zaujímá tvar pravotočivé šroubovice, ale thyminové baze nestackují [4].

2.2. Lipidy

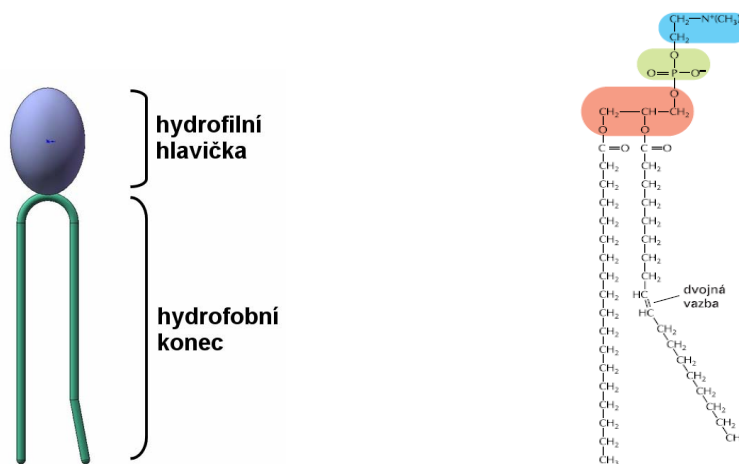
2.2.1 Biologické membrány

Existence biologických membrán je nezbytnou podmínkou existence života, membrány zajišťují integritu buňky i jejích součástí v prostoru. Plazmatická membrána o celkové tloušťce 5 – 8 nm odděluje intracelulární a extracelulární prostor buňky. Membrány ohraničující vnitrobuněčné organely eukaryontní buňky představují bariéru schopnou udržet v jednotlivých organelách rozdílné chemické potenciály iontů a molekul, které jsou hnací silou všech životně důležitých procesů.

Buněčné membrány jsou tvořeny molekulami lipidů (obr. 4) a proteinů. Lipidy se skládají z hydrofilní hlavičky a hydrofobního konce, který je tvořen dvěma uhlovodíkovými řetězci. Molekuly obsahující polární nebo iontovou skupinu a vedle ní část nepolární nazýváme amfipatické.

Nejčastěji zastoupenými membránovými lipidy jsou fosfolipidy. Ty se vyznačují tím, že hydrofilní hlavička je spojena se zbytkem molekuly přes fosfátovou skupinu. Nejběžnějším typem fosfolipidů je u většiny buněk

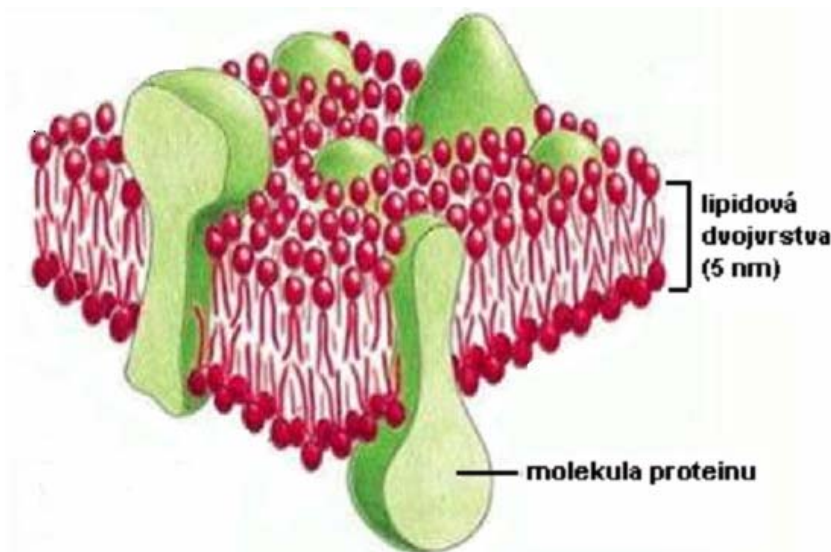
fosfatidylcholin (obr. 5). Malá molekula cholinu je připojena k fosfátu na hydrofilní hlavičce. Molekuly lipidů se ve vodných roztocích spontánně organizují do tzv. dvojvrstev s hydrofilními hlavičkami orientovanými směrem do vodné fáze a s hydrofobními uhlovodíkovými řetězci směřujícími dovnitř dvojvrstvy.



Obr. 4: Molekula lipidu.

Obr. 5: Molekula fosfatidylcholinu [5].

V biologických membránách je vázána řada různých proteinů tvořících 20 - 80 % hmotnosti membrány (podle typu membrány), které zajišťují její specifické funkce (iontové kanály, enzymy, atd.). Dnes je všeobecně přijímán model představující biologickou membránu jako "fluidní mozaiku", kde v dvojvrstvě fosfolipidů jsou zanořené nebo připojené různé proteiny (obr. 6).



Obr. 6: Model biologické membrány jako "fluidní mozaiky" [5].

V živočišných buňkách je přítomností cholesterolu snižována tekutost a propustnost buněčných membrán. Stupeň tekutosti je důležitý pro funkci membrány a musí být udržován v určitých mezích. Při dané teplotě závisí na délce a stupni nasycení uhlovodíkových řetězců fosfolipidů. Membrána se chová jako dvojrozměrná tekutina. Zatímco vertikální pohyb jednotlivých složek membrány je velmi omezen, (tzv. flip-flop pohyb), v laterálním směru se mohou jednotlivé molekuly relativně snadno pohybovat.

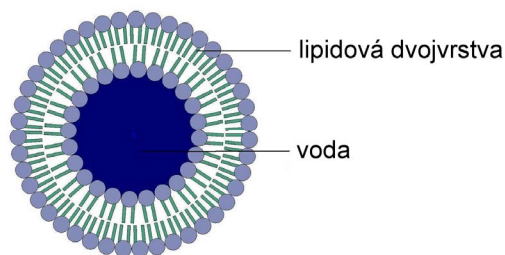
Biologické membrány jsou obecně asymetrické, což znamená, že složení vnitřní a vnější části dvojné vrstvy lipidů se liší.

Skrz plasmatickou membránu mohou procházet malé a nenabitě molekuly, jako je např. voda či oxid uhličitý, ostatní molekuly musejí být přeneseny některým membránovým transportním systémem. Membránový transport se dá rozdělit z termodynamického hlediska na pasivní a aktivní. Pokud probíhá látkový tok přenášené látky ve směru záporného gradientu elektrochemického potenciálu (tedy ve směru „spádu“ elektrochemického potenciálu transportované látky), jedná se o pasivní transport. Pasivní transport iontů zajišťují kanály, které přenášejí ionty na základě difúze. Transport pomocí iontových přenašečů, tzv. ionoforů, nazýváme usnadněnou difuzí.

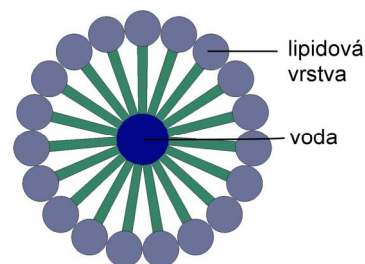
V biologických membránových systémech se setkáváme i s přenosem látek proti směru poklesu elektrochemického potenciálu. K tomu je však potřeba dodávat energii z vnějšího zdroje, což je základním rysem aktivního transportu. K přenašečům aktivního transportu patří např. iontové pumpy. Pomocí aktivního transportu může být přenášena jedna molekula (uniport) ale i dvě molekuly současně (symport či antiport). Velké částice jsou do buňky přenášeny pomocí endocytózy [6, 7], která je podrobněji popsána v kapitole 2.3.3.

2.2.2. Liposomy

Syntetické váčky tvořené dvojvrstvou lipidů oddělující vnitřní a vnější prostředí, které se liší chemickým složením, nazýváme liposomy nebo také vesikuly (obr. 7). Nejčastěji jsou liposomy tvořeny fosfolipidy. Pokud je rozpustíme ve vodné fázi, dojde samovolně ke vzniku liposomů nebo micel. Micely jsou tvořené pouze jednou vrstvou fosfolipidů, jak je vidět na obr. 8. O tom, zda vznikne liposom nebo micela, rozhoduje velikost a struktura použitých fosfolipidů [8].

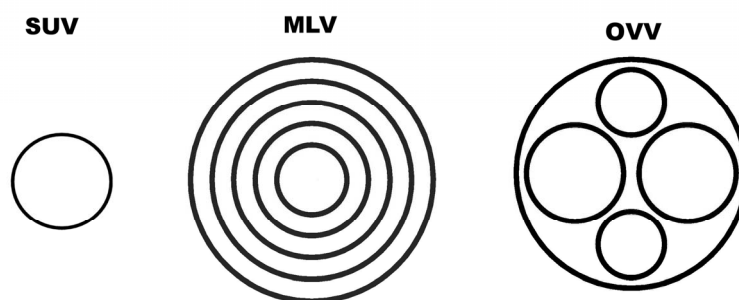


Obr. 7: Liposom [2]



Obr. 8: Micela [2].

V závislosti na způsobu přípravy mohou vzniknout liposomy jednovrstevné či mnohovrstevné o velikosti několik desítek nanometrů až mikrometrů. Jednovrstevné liposomy se dělí podle velikosti na malé - SUV (small unilamellar vesicle) s velikostí 15 - 25 nm, střední – IUV (intermediate-size unilamellar vesicle), jejichž velikost se pohybuje ve stovkách nanometrů, velké - LUV (large unilamellar vesicle) s průměrem kolem jednoho mikrometru a obrovské - GUV (giant unilamellar vesicle) s velikostí od několika jednotek až po pár desítek mikrometrů, případně až do 300 mikrometrů. Velikost mnohovrstevných liposomů - MUV (multilamellar vesicle) se obvykle pohybuje ve stovkách nanometrů. Zvláštním případem mnohovrstevných liposomů jsou oligovesikulární liposomy - OVV (oligovesicular vesicle), jenž obsahují ve své vnitřní části několik menších liposomů. Schematické zobrazení dělení liposomů je zobrazeno na obr. 9.



Obr. 9: Schematické znázornění dělení liposomů podle počtu vrstev a velikosti.

Protože základem biologických membrán jsou dvojité vrstvy lipidů, staly se uměle připravené liposomy vhodným modelovým systémem pro studium

biomembrán. Pokud liposom vzniká ve vodném prostředí obsahující látky rozpustné ve vodě, jsou tyto látky uzavřeny do vnitřního prostředí liposomu. Díky této schopnosti liposomů a jejich stabilitě jsou v posledních letech využívány i v lékařství pro transport léčiv přímo do tkání [9, 10]. Liposomy jsou mnoha buňkami absorbovány fúzí s jejich plasmatickou membránou, tzv. endocytózou [11, 12], viz. kapitola 2.3.3.

Strukturní podobnosti liposomů a biologických membrán se mimo jiné využívá pro sledování transportu molekul skrz membránovou strukturu.

2.2.3. Vznik agregátů

Hydrofobní efekt zvyhodňuje z termodynamického hlediska agregaci amfifilních molekul. Hydrofilní částí může být polární či iontová skupina a hydrofobní část je tvořena jedním nebo více uhlovodíkovými řetězci. Mezi agregovanými molekulami a jejich okolím se uplatňuje řada stabilizujících interakcí, jako jsou van der Waalovy síly, sterické repulze uhlovodíkových řetězců či interakce na rozhraních [13]. Amfifilní molekuly po přidání do vodného roztoku snižují jeho povrchové napětí, proto jsou také nazývány jako povrchově aktivní látky či tenzidy.

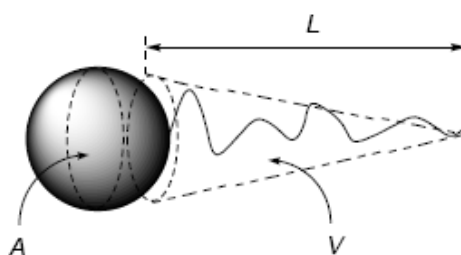
Po přidání tenzidů do vody vznikají spontánně agregáty při překročení tzv. kritické micelární koncentrace. Vlastnosti agregátů ovlivňuje především struktura amfifilu, ale také složení systému nebo teplota. Důvodem agregace jsou tzv. hydrofobní interakce. Jejich podstatou je poměrně značný vzrůst entropie (zhruba okolo $140 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) při přechodu tenzidu z „monomerního“ do agregovaného stavu, tento vzrůst entropie je způsoben desolvatací hydrofobních uhlovodíkových řetězců. Z hlediska entalpie může být agregace tenzidů procesem exotermním (iontové tenzidy) nebo endotermním (neiontové tenzidy), změna entalpie při agregaci se pohybuje okolo $10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [8].

Druh vznikajícího agregátu závisí na vzájemném poměru velikosti a tvaru hydrofilní a hydrofobní části molekuly tenzidu, který je vyjádřen pomocí bezrozměrné veličiny tak zvaného kritického „pakovacího“ parametru CPP (obr. 10) [8]:

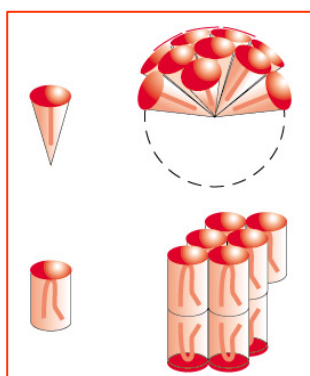
$$CPP = \frac{V}{A \cdot L} \quad , \quad (1)$$

kde V značí objem hydrofobní části, A je plocha připadající na jednu hydrofobní hlavičku tenzidu a L je efektivní délka uhlovodíkového řetězce.

Podle hodnoty CPP tak můžeme odhadnout, jaký typ agregátu vznikne. Mohou to být sférické či elipsoidní micely, válcovité micely uspořádané do hexagonální fáze, lamelární fáze, reverzní hexagonální fáze nebo reverzní micely. Pokud je hodnota CPP přibližně rovna jedné, vznikají lamelární fáze. Dvojvrstvy a liposomy tak nejnáze vytvářejí molekuly tenzidu, které mají relativně velkou hlavičku a dva flexibilní uhlovodíkové řetězce, tedy přibližně válcovitý tvar. Micely vznikají pokud CPP je menší než $1/3$ (obr. 11). Jsou to poměrně málo uspořádané a vysoce dynamické agregáty, zatímco dvojvrstvy v liposomech jsou vysoce uspořádané systémy stabilní po dobu týdnů i měsíců. [14]



Obr. 10: Kritický „pakovací „ parametr – CPP [8].

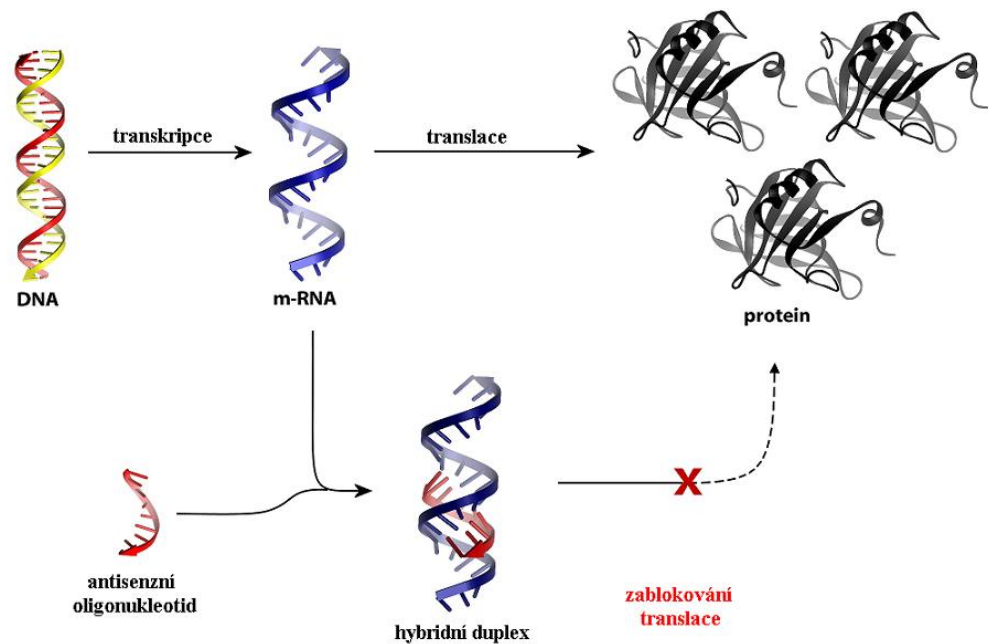


Obr. 11: Vzájemná souvislost struktury amfifilní molekuly a typu vznikajícího agregátu [15].

2.3. Antisenzní terapie

2.3.1. Idea antisenzní terapie

Při expresi genu molekula mRNA přenáší příslušnou genetickou informaci od DNA k ribosomům, kde dochází k syntéze příslušného proteinu. Navázáním antisenzního oligonukleotidu na mRNA vznikne duplex, který znemožní translaci cílové sekvence na mRNA do proteinu (obr.12).



Obr. 12: Schéma antisenzního mechanismu zablokování exprese nežádoucího genu. Po transkripci DNA do molekuly mRNA vznikne navázáním antisenzního oligonukleotidu na cílovou sekvenci mRNA hybridní duplex, který zabrání translaci mRNA do proteinu [16].

Translace cílové sekvence mRNA do nežádoucího proteinu je zablokována buď pasivním, nebo aktivním mechanismem. Při pasivním mechanismu dojde k hybridizaci cílové sekvence mRNA a oligonukleotidu, čímž vznikne duplex, který brání ribosomálnímu komplexu v přečtení genové informace. Při aktivním mechanismu umožní hybridizace navázání enzymu ribonukleázy H (RNáza H), který štěpí hybridní duplexy RNA-DNA takovým způsobem, že molekula RNA je

degradována, zatímco molekula DNA je zachována pro další použití [17]. Některé modifikované oligonukleotidy mají schopnost aktivovat tento enzym, což je pro antisenzní oligonukleotidy výhodné. Po vytvoření hybridního duplexu s komplementárním úsekem mRNA aktivuje oligonukleotid činnost RNázy H na základě strukturní podoby s DNA, čímž dojde k degradaci molekuly mRNA, zatímco antisenzní oligonukleotid zůstane neporušen a je připraven pro další použití. Pro terapeutický účinek pak stačí podstatně menší množství oligonukleotidu.

Obrovský pokrok v porozumění a aplikaci antisenzních oligonukleotidů nastal na konci 70. let minulého století po prvním zveřejnění úspěšného využití antisenzního deoxyoligonukleotidu k zablokování genové exprese viru Rousova kuřecího sarkomu [18]. K dalšímu rozvoji antisenzní terapie přispěla nejen jednoduchost této metody, ale též finanční dostupnost syntetických oligonukleotidů a velký rozvoj v lidském genomovém sekvenování, které bylo dokončeno roku 2003. I v současné době probíhá výzkum zaměřený zejména na využití znalostí lidského genomu. Klasická genová terapie znamená vpravení genetické informace do buněk jako náhrady za geny chybějící nebo poškozené a tím neschopné produkovat odpovídající funkční proteiny, zatímco při antisenzní terapii interagují pouze krátké oligonukleotidy s patologickou mRNA a blokují její přepis. Navíc se mechanismus antisenzní strategie stal významným laboratorním nástrojem pro studování a porozumění biologické funkce nově objevených genů.

2.3.2. Antisenzní oligonukleotidy

Antisenzní deoxyoligonukleotidy jsou krátké úseky DNA (obvykle 15 až 30 nukleotidů), které na základě Watson-Crickova párování bazí hybridizují s komplementární sekvencí molekuly mRNA. Synteticky připravené oligonukleotidy s přirozeným chemickým složením nukleových kyselin jsou uvnitř buněk velmi nestabilní, protože jsou degradovány exo- a endonukleázami, které chrání buňku štěpením nežádoucích nukleových kyselin. Pro účinnou antisenzní strategii je nezbytné, aby oligonukleotidy byly odolné vůči těmto nukleázám a mohly tak působit na cílové molekuly mRNA. Zvýšení stability oligonukleotidů v buněčném prostředí musí být dosaženo jejich chemickou modifikací.

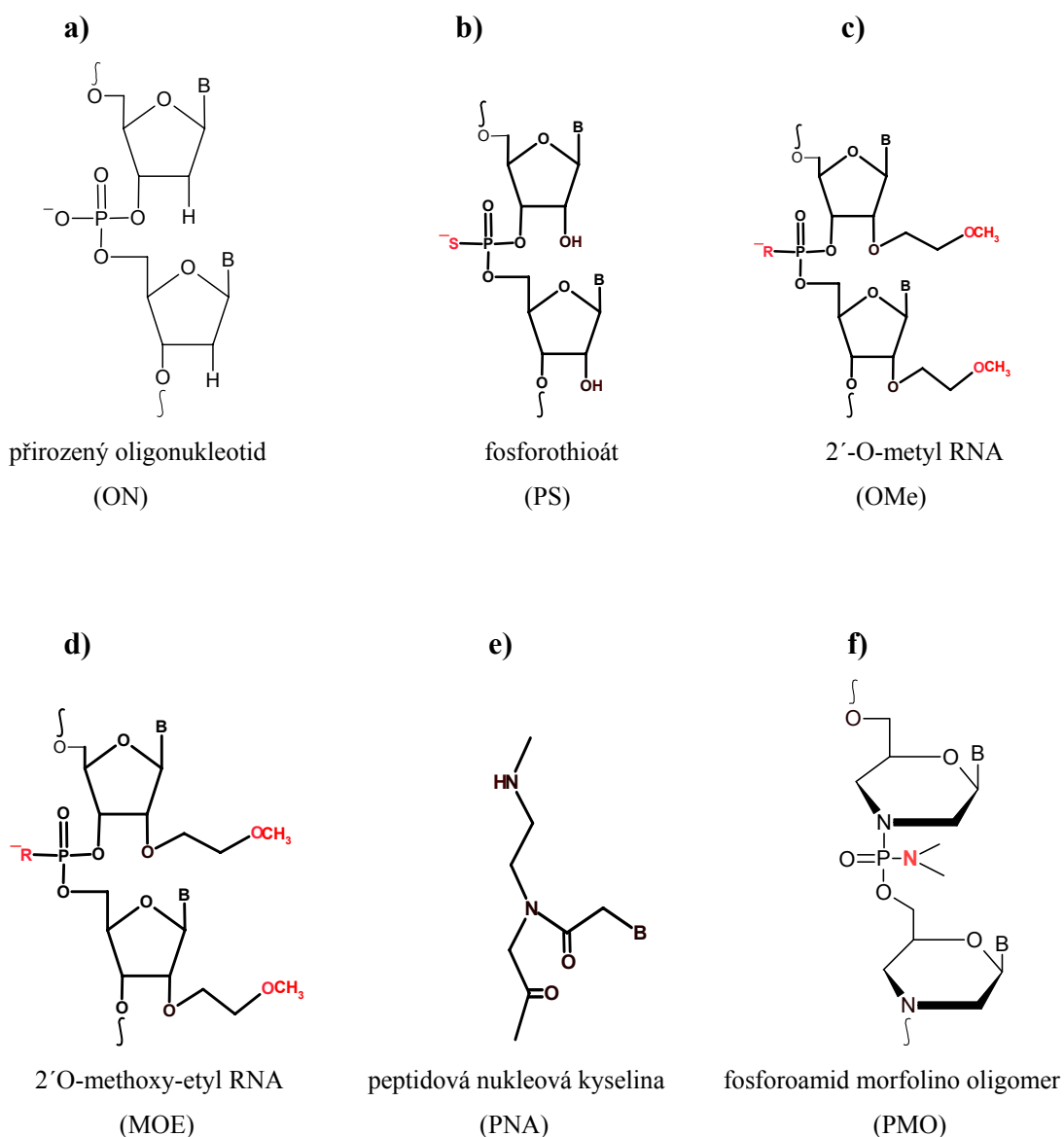
Modifikované oligonukleotidy pro terapeutické využití musí mít několik základních vlastností. Především je důležitá již zmíněná stabilita v buněčném prostředí, aby nedošlo k jejich rozštěpení, a přitom byla zachována specificita vazby

ke komplementární sekvenci bází v nukleové kyselině. Vazba modifikovaného oligonukleotidu musí být dostatečně silná, přinejmenším srovnatelná s nemodifikovaným oligonukleotidem. Dále je požadována schopnost pronikat do buňky skrz buněčnou membránu, aby došlo k jeho optimální distribuci v buňce. V neposlední řadě nesmí být pro organismus toxický. Jak již bylo zmíněno, výhodou antisenzních oligonukleotidů je jejich schopnost aktivovat činnost RNázy H.

V principu lze modifikovat bazi oligonukleotidu, ale tím dochází ke ztrátě specifčnosti vazby, proto se největší pozornost upírá k nalezení vhodné modifikace cukr-fosfátové spojky [3]. V současné době jsou fosforothioáty nejrozšířenější typ modifikace antisenzních oligonukleotidů [19]. Ve fosforothioátech je jeden ne vazebný kyslík fosfátové skupiny nahrazen sírou (obr. 13b) za účelem ochrany před působením nukleáz [20]. Tím získaly oligonukleotidy větší enzymatickou stabilitu a schopnost aktivovat činnost RNázy H přitom zůstala zachována [21]. Nevýhodou této modifikace je horší specifčnost než u přirozených oligonukleotidů. Fosforothioáty se mohou nespecificky vázat k proteinům a tím se mohou stát pro buňku toxickými [20].

Další možností chemické modifikace oligonukleotidu je modifikace cukru, například připojením metylové skupiny na 2'-kyslík ribózy: 2'-O-metyl RNA (obr. 13c), nebo vytvořením metylenového můstku mezi 2'-kyslíkem a 4'-uhlíkem: 2'-O-methoxy-etyl RNA (obr. 13d) [3]. Tyto modifikace jsou méně toxické než fosforothioáty a zvyšují afinitu ke komplementární mRNA, ale neindukují její štěpení v důsledku činnosti RNázy H [3].

Další generací modifikovaných oligonukleotidů zvyšujících afinitu a nukleázovou odolnost jsou dva typy nenabitých oligonukleotidů, peptidová nukleová kyselina (PNA) a fosforoamidát morfolino oligomer (PMO), ve kterých je cukr-fosfátová spojka nahrazena polyamidovou spojkou v případě PNA (obr. 13e) a v případě PMO fosfoamidátovou spojkou (obr.13f) [3]. Jejich nevýhodou je opět neschopnost aktivovat činnost RNázy H.



Obr. 13: Různé analogy nukleových kyselin zmíněné v textu, B značí jejich bazi.

2.3.3. Doprava oligonukleotidů do buňky

Velkým problémem spojeným s aplikací antisenzní terapie je doprava oligonukleotidu do živé buňky, kde by měl interagovat s cílovou mRNA. Plazmatická membrána buněk tvoří pro velké molekuly, a tedy i molekuly oligonukleotidů, velkou překážku. Fosfolipidová dvojvrstva membrány brání vstupu iontů, polárních molekul, či molekul záporně nabitých, protože vnitřní prostředí membrány je hydrofobní. U některých modifikovaných oligonukleotidů byla pozorována schopnost pronikat plazmatickou membránou, ale zároveň se u nich objevily nežádoucí vlastnosti, např. pokles hybridizace, vyšší toxicita či vzrůst

nespecifických efektů [3, 20, 22]. V současné době je proto věnována velká pozornost hledání podpůrných prostředků zvyšujících účinnost jeho dopravy do buňky a zároveň chránící oligonukleotid před degradací. Velký rozdíl ve schopnosti přijmout molekulu oligonukleotidu je i mezi různými typy buněk.

Hlavní roli při průchodu modifikovaných oligonukleotidů plazmatickou membránou hraje endocytóza, jak ukázaly např. studie Weyermanna a kol [23]. Tento termín používaný pro četné metody vstupu do buňky, zahrnuje receptorově zprostředkovanou endocytózu, receptorově nezávislou endocytózu, fago- i pinocytózu a vstup přes kaveoly. Podrobný popis endocytózy je např. v [7]. V případě receptorově zprostředkované endocytózy se tak děje za pomoci specifických receptorů rozmístěných na buněčném povrchu. Ligandově aktivované receptory se po navázání ligandu v membráně shlukují do místa, jehož vnitřní strana je pokryta tyčinkovitými podjednotkami bílkoviny klathrinu. Tato část membrány se vchlipuje dovnitř buňky přičemž vzniká váček pokrytý klathriny, který se odděluje od membrány a posléze je uvolněn do cytosolu. Nově vzniklé membrány endocytotického váčku se zbavují klathrinového pokrytí a spojují se spolu nebo s tzv. třídícím endosomem. Tento časný endosom třídí obsah váčku a připravuje ho na další transport. Prostředí uvnitř endosomu je kyselé (pH 5-6). Pokles pH v těchto organelách zajišťuje oddělení ligandu od receptoru, který se může následně vrátit v transportním váčku do plazmatické membrány k opětovnému použití. Přeměna časného endosomu v pozdní endosom je spojena s dalším poklesem pH. Tím je zabráněno další fúzi s endocytotickými váčky, či jinými třídícími endosomy. Zbylý obsah endosomu je předáván lyzozomům obsahujícím hydrolytické enzymy schopné štěpit jeho obsah. Společnou charakteristikou těchto hydroláz je nízká hodnota pH (~ 5). Na změně hodnoty pH jsou založeny mnohé strategie dopravy léčiv do živé buňky. Fagocytózu nejúčinněji provádějí fagocytotické buňky, které organismy chrání před infekcí, neboť v organismu pohlcují cizí mikroorganismy. Makropinocytóza usnadňuje příjem tekutin do buňky.

Mnohé ze systémů zvyšující účinnost dopravy oligonukleotidů do buněk byly původně vyvíjeny pro transport genů v klasické genové terapii, nebo pro transport hydrofilních léčiv do živých buněk. V současné době jsou rozvíjeny dvě hlavní strategie pro transport oligonukleotidů. První spočívá v uložení oligonukleotidu do lipidické nebo nelipidické schránky, druhou možností je vytvoření komplexu

oligonukleotidu s molekulou, která kompenzuje jeho záporný náboj (např. oligopeptid nebo porfyrin).

Hojně používaným podpůrným prostředkem pro dopravu oligonukleotidů jsou kationické liposomy [23-25], neboť mají několik výhod, jako je spontánní tvorba komplexu se záporně nabitým oligonukleotidem nebo menší toxicita než u jiných tradičních *in vitro* metod (např. kalcium fosfátová precipitace nebo elektroporace). Kladně nabité liposomy nejen zvyšují účinnost transportu oligonukleotidů přes buněčnou membránu, ale také ho chrání před enzymatickou degradací v cytosolu buňky. Jejich nevýhodou může být akumulace komplexu liposomu a oligonukleotidu v endosomech následkem endocytotického transportu do buňky. V důsledku odchytní komplexu endosomem nemůže oligonukleotid *in vivo* interagovat s cílovou mRNA. Původně byla tato metoda zkoumána pro stimulaci vstupu DNA do buněk v klasické genové terapii a až následně byla převzata pro studium antisenzní terapie. První experimenty, u kterých byl úspěšně použit kationický lipid, byly publikovány v roce 1987 v práci Felgnera a kol. [26]. Dnes je k dispozici již mnoho komerčních produktů, ale některé jsou toxické a málo stabilní v přítomnosti proteinového séra. Mezi nejběžněji používané kationické lipidy patří např. 1,2-dioleoyl-3-trimetylammonium-propan (DOTAP) či lipofectin [23, 27]. Lipofectin představuje již druhou generaci liposomálních agentů a sestává se ze dvou lipidových komponent, kladně nabitého lipidu N-[1-(2, 3 dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylammonium chloridu (DOTMA) a neutrálního lipidu dioleoylfosfatidyletanolaminu (DOPE). Fúzogenní DOPE je velmi důležitou složkou kationických liposomů, uplatňuje se při stabilizaci většiny kationických lipidů v lipidové dvojvrstvě a může způsobovat buněčnou penetraci. V několika studiích bylo ukázáno, že komplex DNA s liposomem obsahující složku DOPE destabilizuje endosom a umožňuje tak uvolnění komplexu do cytosolu [28]. V porovnání s jinými transportními prostředky se jeví lipofectin jako nejúčinnější, ale vzhledem k tomu, že je silně cytotoxický, není vhodný pro použití *in vivo* [23]. Resina a kol. [24] vyvinuli liposomální systém, v němž jsou zastoupeny dioktadecylamidoglycylspermidin (DOGS) a dioleoyl fosfatidyletanolamin (DOPE). Účinnost tohoto systému byla testována na HeLa pLuc/705 buněčné linii (lidské nádorové buňky děložního čípku), která byla inkubována s komplexem 2'-O-Me oligonukleotidu a kationických lipidů. Tento systém se ukázal vhodným transportním prostředkem, neboť došlo k akumulaci komplexu v jádře, což dokazuje účinné uvolnění z endosomu. Jak

ukázala studie Lappalainen a kol. [25] na dvou kationických lipidech, polykationickém 2,3-dioleoyloxy-N[(2(sperminkarboxamido)etyl]-N,N-dimetyl-1-propanaminium trifluoroacetát (DOSPA) a monokationickém dimetyldioktadecylamonium bromidu (DDAB), pro transport oligonukleotidů dovnitř buňky je důležitý typ liposomu, délka oligonukleotidu, celkový náboj komplexu oligonukleotid-liposom a typ buňky. V experimentech byly použity CaSki buňky (buněčná linie lidské rakoviny děložního čípku) obsahující lidský papilomavirus DNA. Kationické liposomy se tak mohou stát vhodným nástrojem antisenzní terapie v léčbě lidských papillomavirových infekcí. Protože je transport a distribuce oligonukleotidů závislá na typu buňky, je vhodné, aby každý systém stimulující dopravu do buňky byl testován na buňkách, které budou cílovými buňkami *in vivo* při konkrétní léčbě.

Již před dvaceti lety se objevila myšlenka zvýšit účinnost buněčné dopravy kovalentním navázáním kationického peptidu na oligonukleotid [29]. Následně byla prokázána biologická aktivita antisenzního oligonukleotidu spojeného s *Drosophila* Antennapedia transkripčním faktorem (Penetratin), která byla připisována schopnosti peptidu pronikat buněčnou membránou [30]. Dalším objeveným peptidem se schopností pronikat do buňky - CPP (z anglického cell penetrating peptide) byl HIV-1 Tat (transactivator of transcription) [31]. V obou případech je za dopravu peptidu do buňky odpovědný krátký úsek kladně nabitých aminokyselin. Původně se předpokládalo, že mechanismus vstupu CPP do buňky není založen na endocytóze, ale nedávné studie [22, 32] prokázaly endocytotický mechanismus při nízkých koncentracích. Zda se jedná o receptorově řízenou endocytózu, kaveoly, či makropinocytózu stále není jasné, může to záviset na typu buňky, druhu přepravované látky nebo jiných faktorech. Při vyšších koncentracích CPP zřejmě dochází k přímému průchodu molekul lipidovou dvojvrstvou v důsledku destabilizace membrány působením CPP. Limitující překážkou pro účinné působení antisenzních oligonukleotidů transportovaných na základě endocytózy je opět jejich odchytení v endosomech, proto se pozornost soustředila na prostředky usnadňující uvolnění oligonukleotidů z těchto degradujících váčků, tzv. endosomální agenty. Dodatečné přidání endosomálních agentů do buněk, jako je chlorochinin, sacharóza nebo Ca^{2+} podpoří uvolnění oligonukleotidů do cytosolu. Žádná z těchto alternativ však není použitelná *in vivo*, proto jsou zkoumány alternativní strategie pro narušení endosomu. Jednou z nich je fotochemická strategie, založená na tvorbě složek

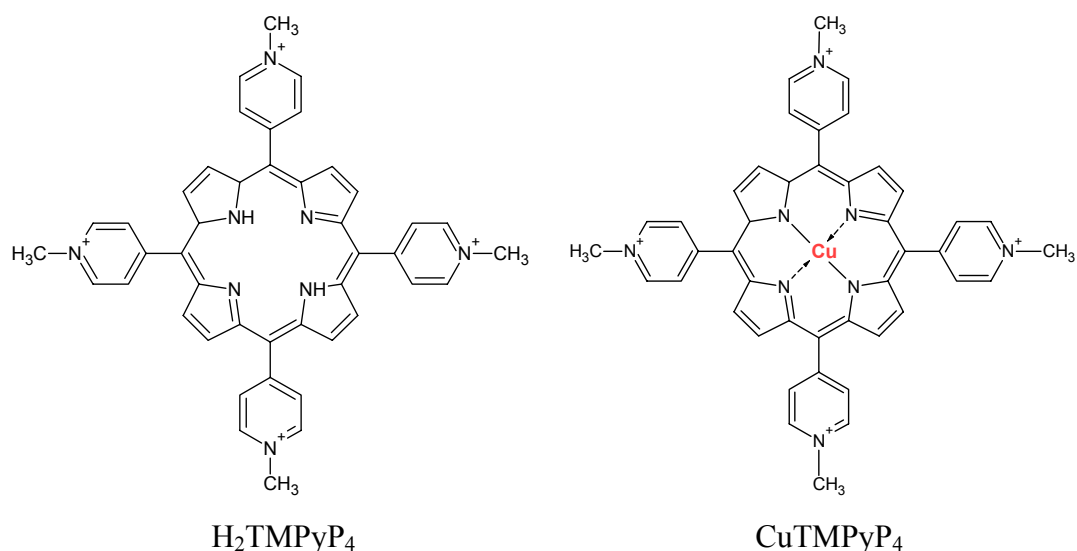
obsahujících reaktivní kyslík. Po ozáření dojde k poškození endosomu a následnému uvolnění odchyteného léčiva. Mnoho studií poukázalo na klíčovou roli argininového postranního řetězce při navázání CPP a jejich vstupu dovnitř buňky. Bylo zkoumáno mnoho alternativ RxR syntetických CPP a jako nejúčinnější peptid se osvědčil (R Ahx-R)₄R, ve kterém Ahx značí 6-aminohexanovou kyselinu. V komplexu s neutrálními analogy oligonukleotidů PNA a PMO (phosphorodiamidate morpholino oligomers) byly testovány jako podpůrné prostředky stimulující jejich transport. Úspěšnost transportu byla vyhodnocena Kolovou metodou založenou na opravě sestřihu [33]. Ukázalo se, že komplex (R-Ahx-R)₄AhxB-PMO je akumulován v endosomech. I přesto vykazoval korekci sestřihu. V současné době není definitivní vysvětlení pro lepší aktivitu (R-Ahx-R)₄ peptidu než u jiných na arginin bohatých CPP. Podobně je tomu u druhé třídy CPP bohatých na arginin, známých jako R₆Pen. Jsou založeny na dobře známém peptidu Penetratinu, ke kterému bylo na N-konci přidáno 6 argininových reziduí. V budoucnu lze očekávat rozvoj CPP pro transport PMO a PNA za účelem studia různých biologických procesů, včetně korekce sestřihu, kde se ukazuje být nejnadějnější aplikace v léčení genetické nemoci DMD (Duchenne muscular dystrophy).

Efektivními transportními prostředky se také ukázaly být deriváty kationických porfyrinů. Tyto molekuly byly použity jako sondy pro zjištění struktury nukleových kyselin, dále jsou využívány pro lokalizaci nádoru a některé odvozené porfyriny byly použity při léčení a detekci mnoha typů rakovinných buněk. Byla u nich zjištěna schopnost procházet jadernou membránou. Výše zmíněné vlastnosti z nich dělají vhodné kandidáty pro dopravu nukleových kyselin skrz buněčné membrány [34]. Kationické porfyriny tvoří nekovalentní komplexy s jednovláknovými oligonukleotidy a transportují je do jádra buňky. Navíc je chrání před nukleázovou degradací v cytosolu, a proto je transport oligonukleotidů v komplexu s porfyriny narozdíl od kationických liposomů nezávislý na přítomnosti séra. Ve studiích [34, 35] byly zkoumány vlastnosti dvou porfyrinů, 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphine – H₂TMPyP₄ a 5,10,15,20-tetrakis(4-trimethylammoniofenyl)-porphine – H₂TMAP. Podle Flynn a kol. [34] ve vysoké míře ovlivňuje transport celkový náboj komplexu a koncentrace jednotlivých složek, např. ve vysoké koncentraci může porfyrin agregovat v přítomnosti nukleové kyseliny a stupeň agregace může ovlivnit dopravu do buňky. Dále bylo ukázáno, že antisenzní aktivita závisí nejen na druhu porfyrinu a modifikaci oligonukleotidu, ale

také na typu buňky, stejně jako při studiu jiných transportních systémů. Jak již bylo zmíněno, porfyriny mohou hrát důležitou roli při léčbě nádorových buněk, a protože jaterní buňky jsou hlavním typem buněk odpovědných za jejich metabolismus, mohou porfyriny řídit dopravu materiálu přímo do tohoto typu buněk.

Kationické porfyriny jsou metodami optické spektroskopie studovány i na Oddělení fyziky biomolekul Fyzikálního Ústavu UK. Ve studii [36] byl vhodným transportním prostředkem oligonukleotidů stanoven porfyrin H_2TMPyP_4 (obr. 14a) pomocí fluorescenční spektroskopie. Experiment byl prováděn na buněčné linii 3T3 myších fibroblastů. Fluorescenční signál porfyrinu z oblasti jádra prokázal úspěšný vstup komplexu dovnitř buňky a ochranu oligonukleotidu před nukleázovým štěpením. Dalším zkoumaným porfyrinem je metalovaná forma H_2TMPyP_4 , a to $Cu^{2+5,10,15,20}$ -tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphine - $CuTMPyP_4$ (obr. 14b) [37], který jsem používala i při experimentech ve své diplomové práci, protože na rozdíl od své nemetalované formy nevykazoval při měření Ramanových spekter vysokou fluorescenci.

$CuTMPyP_4$ má planární porfyrinové jádro a jeho čtyři meso-substituenty (N-methylpyridinium) jsou k této rovině natočeny kolmo. Díky kladnému náboji meso-substituentu je $CuTMPyP_4$ dobře rozpustný ve vodě a netvoří zde agregáty. Mědnatý kation Cu^{2+} má v základním a excitovaném stavu rozdílné koordinační vlastnosti. V základním stavu leží měď v planární rovině porfyrinu, kde je spojena koordinačními vazbami s pyrolovými dusíky na porfyrinu, a nemá žádný axiální ligand. Při excitaci dochází ke zvětšení velikosti porfyrinového kruhu a vysouvání mědi z planární roviny porfyrinu, měď je navíc přístupná axiálnímu ligandu. Po navázání ligandu vzniká komplex zvaný exciplex, protože je stabilní jen po dobu, kdy se měď nachází v excitovaném stavu [38].



Obr. 14: Struktura studovaných porfyrinů.

2.4. Měřicí metody

2.4.1. Absorpční spektroskopie

Elektronová absorpční spektroskopie využívá poklesu intenzity optického záření procházejícího absorbujičím prostředím [39]. Při absorpci záření molekulou dojde k jejímu přechodu ze základního stavu do stavu excitovaného, tedy na vyšší energetickou hladinu. Pravděpodobnost přechodu (a tedy i velikost intenzity absorbovaného záření) je dána velikostí dipólového momentu přechodu. Absorpční spektrum je ovlivněno strukturou elektronově-vibračních přechodů.

Průchod monochromatického záření o frekvenci ν absorbujičím látkou se projevuje zmenšením jeho počáteční intenzity I_ν^0 na hodnotu I_ν . Tento útlum můžeme popsat pomocí absorbance $A(\nu)$:

$$A(\nu) = \log \frac{I_\nu^0}{I_\nu} \quad (2)$$

Intenzita I_ν^0 přitom klesá exponenciálně s dráhou, kterou záření urazí v absorbujičím látce. Při zanedbání vícefotonových procesů tuto závislost charakterizuje Lambertův zákon, podle kterého je absorbance $A(\nu)$ přímo úměrná dráze x :

$$A(\nu) = b(\nu) \cdot x , \quad (3)$$

kde $b(\nu)$ je koeficient útlumu. Sloučením rovnic (2) a (3) získáme Lambertův zákon ve tvaru:

$$I(\nu) = I_{\nu}^0 10^{-b(\nu)x} . \quad (4)$$

Pokud je absorbující látka rozpuštěna v neabsorbujícím rozpouštědle tak, aby byl výsledný roztok silně zředěný, platí pro koeficient útlumu $b(\nu)$ Beerův zákon, podle kterého je tento koeficient je přímo úměrný koncentraci látky:

$$b(\nu) = \varepsilon(\nu) \cdot C , \quad (5)$$

kde $\varepsilon(\nu)$ je molární extinkční koeficient a C je molární koncentrace absorbující látky. Spojením Beerova zákona platného pro neinteragující molekuly (5) a vztahu (3) vznikne tzv. Lambert-Beerův zákon:

$$A(\nu) = \varepsilon(\nu) \cdot C \cdot x . \quad (6)$$

Pokud známe extinkční koeficient zkoumané látky a délku dráhy záření v absorbující látce, můžeme pomocí měření absorpce zjistit koncentraci dané látky v roztoku.

2.4.2. Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je jedna z technik vibrační spektroskopie [39]. Je založena na nepružném rozptylu světla při jeho interakci s látkou. Při ozáření vzorku monochromatickým světlem je většina záření rozptýlena pružně, dojde k tzv. Rayleighovu rozptylu, pouze 1 foton z 10^6 - 10^7 je rozptýlen nepružně. Pokud dojde ke změně stacionárního stavu rozptylujícího objektu, nazývá se tento rozptyl Ramanův, neboť právě C. V. Raman poprvé zaznamenal tento jev a v roce 1930 za něj získal Nobelovu cenu.

Při Rayleighovu rozptylu nedochází ke změně energie dopadajícího záření ν_0 , zatímco při Ramanově rozptylu dojde po interakci molekuly s budícím zářením

ke změně jeho energie. Molekula přechází mezi stacionárními vibračními stavy 1 a 2. Pro rozptýlený foton platí zákon zachování energie:

$$h\nu_R = h\nu_0 \pm (E_2 - E_1) \quad (7)$$

kde h je Planckova konstanta, ν_R je frekvence rozptýleného záření a $E_2 > E_1$ jsou energie vibračních hladin molekuly. Při přechodu molekuly z nižší energetické hladiny na vyšší se energie rozptýleného fotonu zmenší a v rovnici (1) platí znaménko „-“. Tato spektrální oblast energií emitovaného fotonu se nazývá Stokesova větev. Znaménko „+“ v rovnici (1) odpovídá tzv. antistokesově větvi. Čáry Stokesovy a antistokesovy větve jsou symetricky, ale s různou intenzitou, rozmístěny kolem elasticky rozptýleného záření o frekvenci ν_0 . Obsazení energetických hladin v molekule je v termodynamické rovnováze dáno Boltzmannovým rozdělením, proto se více molekul nachází ve stacionárním stavu s nižší energií. Důsledkem je větší intenzita Stokesovy větve než antistokesovy.

Podle klasické teorie budí dopadající záření na molekulu dipólový moment μ . V prvním přiblížení ho můžeme popsat pomocí oscilátoru:

$$\mu = \alpha_0 E_0 \cos(\omega t) + \frac{1}{2} \frac{\partial \alpha}{\partial q_k} E_0 q_k [\cos(\omega - \omega_k)t + \cos(\omega + \omega_k)t] \quad (8)$$

kde α je tenzor polarizovatelnosti, E_0 je elektrická intenzita dopadajícího záření, q_k je normální souřadnice charakterizující daný mód vibrace, ω je frekvence dopadajícího záření ($\omega = 2\pi\nu_0$) a ω_k frekvence rozptýleného záření. První člen rovnice (8) odpovídá elastickému rozptylu, zbylé dva členy Stokesovu a antistokesovu rozptylu. Z této rovnice dále vyplývá, že intenzita Ramanova rozptylu závisí na velikosti změny tenzoru polarizovatelnosti α při přechodu mezi stavy 1 a 2. Proto je vibrační přechod v Ramanově rozptylu pozorován pouze tehdy, dochází-li ke změně tenzoru polarizovatelnosti α molekuly. Tím získáváme pro vznik linií ve spektru výběrová pravidla, která jsou dána symetrií molekuly. Pokud tedy známe symetrii molekuly, je možné určit aktivitu vibračního módu pomocí teorie grup.

V kvantovém popisu se pro výpočet intenzity Ramanova rozptylu zavádí tenzor rozptylu α :

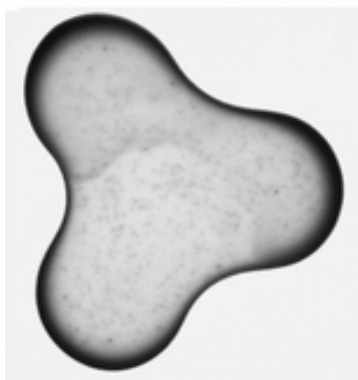
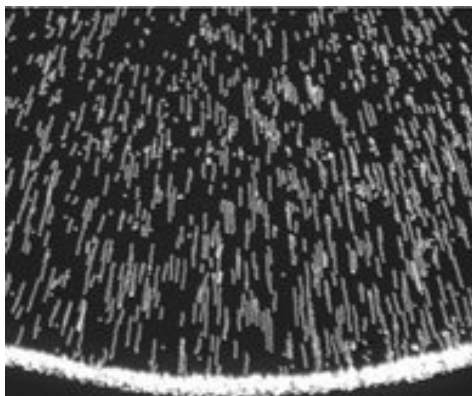
$$(\alpha_{1,2}) = \sum_{s \neq 1,2} \left(\frac{\langle \psi_2 | D_i | \psi_s \rangle \langle \psi_s | D_j | \psi_1 \rangle}{E_1 - E_s + h\nu_0} + \frac{\langle \psi_2 | D_j | \psi_s \rangle \langle \psi_s | D_i | \psi_1 \rangle}{E_1 - E_s - h\nu_0} \right), \quad (9)$$

kde D je operátor elektrického dipólového momentu. Ve výrazu (9) se sčítá přes všechny stacionární vibrační a elektronové stavy s .

Význam Ramanovy spektroskopie spočívá v její citlivosti jak vůči změnám polohy atomů a vazebných sil v molekule tak i vůči interakcím s okolním prostředím, tím se stává vhodným nástrojem pro studium struktury a funkce biomolekul. Největší nevýhodou Ramanova rozptylu je malá citlivost a tedy nutnost používat poměrně velké koncentrace měřených látek, protože intenzita pásů závisí na koncentraci molekul s odpovídající vibrací.

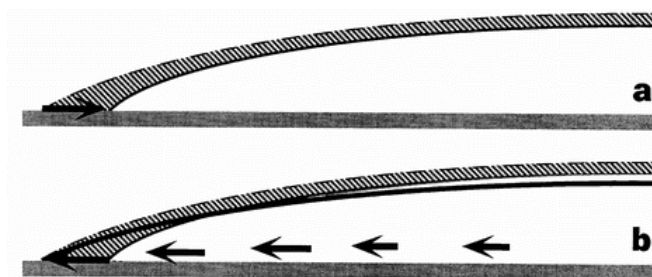
Existuje několik metod, jak zvýšit intenzitu Ramanova rozptylu. Zvolením vhodné excitační vlnové délky lze za určitých podmínek dosáhnout rezonančního zesílení. Další metodou, jak zvýšit intenzitu Ramanova rozptylu, je interakce povrchového plasmonu kovové nanočástice vhodného substrátu se studovanou molekulou.

Alternativní metodou pro zlepšení Ramanova signálu biologických vzorků je zvýšení jejich koncentrace před aplikací Ramanovy spektroskopie. V několika nedávno publikovaných studiích [40] se objevila nová metoda Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků neboli DCDR (drop coating deposition Raman) založená na principu vysychání kávové kapičky [41] umožňující měření roztoků s koncentrací biomolekul menší než 1 μM . Pokud kapičku kávy, nebo jakéhokoliv rozpouštědla s pevnými částicemi, necháme vysychat na pevném povrchu, začnou se částice koncentrovat podél obvodu (obr. 15). Původně byly částičky rozptýlené v celém objemu kapičky, ale působením kapilárních toků se přemístily na okraj kapičky, protože kapalina odpařovaná z okrajů kapičky je nahrazována kapalinou z vnitřku. Částice na okraji takto vyschlé kapky jsou v tzv. skelné fázi, tedy jakémsi přechodem mezi pevnou fází a roztokem.

a**b**

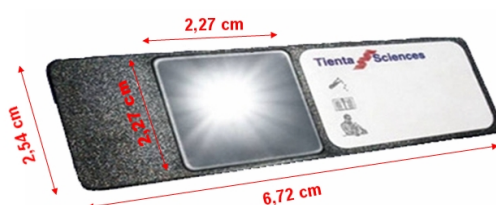
Obr. 15: Stopy vysychajících kapiček a ukázka fyzikálních jevů obsažených v procesu vysychání kapiček. **a** – vysychající kávová kapička o průměru 2 cm obsahující 1% pevných látek vytvářející obvodový prstenec zvýrazněný v oblastech velkého zakřivení. **b** – demonstrace pohybu mikročástic (bílé čárky) pomocí mikroskopu (přibližně 90% jich směřuje k okraji kapky) [41].

Obr. 16 ukazuje vznik proudů směřujících ven z malé kruhové kapičky pomalu vysychající na pevném povrchu. Odpařovací tok působí na celém povrchu kapičky a pokud by v ní nepůsobily žádné proudy, došlo by ke změně výškového profilu kapičky (obr. 16a). Z okrajů kapičky by byla odstraněna kapalina (na obr. 16a vyznačena šrafovaně) a kapička by se smrštila. Poloměr kapičky se ale zmenšit nemůže, proto kapalina začne proudit směrem ven, jak je ukázáno na obr. 16b. Tento tok kapaliny směrem ven nese pevné částičky k okrajům kapičky. Po vyschnutí kapičky jsou v DCDR technice získávány spektra právě z těchto okrajových míst, kde se hromadí nanesený materiál [42].



Obr. 16: Mechanismus toků směřujících ven během vypařování, obrázky **a** a **b** ukazují oblasti vypařování kapičky z profilu. **a** – Výsledkem vypařování bez toků je scvrknutí kapičky. **b** – vznik kompenzačních toků potřebných pro udržení zafixované okrajové linie [41].

V DCDR technice je důležitý výběr materiálu, na který jsou kapičky nanášeny. Materiál by měl mít několik základních vlastností: nízkou optickou absorbanci, vysokou optickou odrazivost a minimální Ramanův signál. Neméně důležitá je hydrofobicita materiálu umožňující vysychání kapiček. Podle studie, kterou provedl Zhang a kol. [40], se ukázala být nejvhodnějším materiálem nerezová ocel pokrytá tenkou vrstvou teflonu (obr.17). V práci Filika J. a Stona N. se osvědčila leštěná destička z fluoridu draselného [42].



Obr. 17: Komerčně dostupná destička Tienta Sciences - SpectRIM™ z nerezové oceli pokrytá tenkou vrstvou teflonu od firmy Bruker Optics.

Největší výhodou DCDR metody jsou požadovaná malá množství a nízké koncentrace měřených roztoků. Pro získání kvalitních a reprodukovatelných spekter stačí objem vzorku roztoku v jednotkách μl s koncentrací biomolekul menší než $1 \mu\text{M}$ [40]. Jakmile je materiál vysušen, zůstává stabilní bez jakýchkoli změn Ramanových spekter po několik měsíců, možná i let [43]. Navíc bylo ve studii

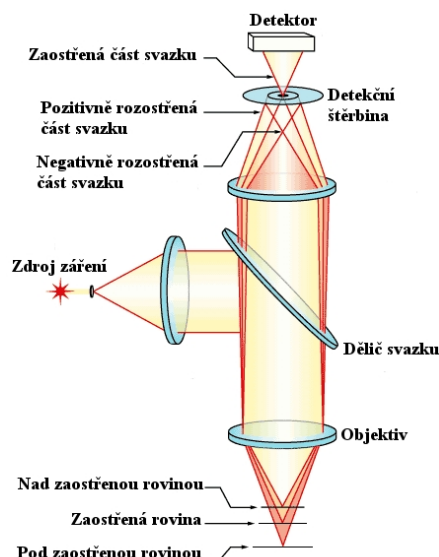
Zhanga a kol. [40] prokázáno, že Ramanova spektra získaná z vysušených kapiček a koncentrovaného roztoku jsou identická.

V poslední době se technika DCDR stává oblíbenou metodou pro svou jednoduchost, rychlost a dostupnost. Ramanova spektroskopie citlivá na změny v chemické struktuře biomolekul ve spojení s metodou založenou na efektu vysychání kávové kapičky se tak stává vhodným nástrojem v analýze proteinů s malou koncentrací. Např. standardní Ramanova spektroskopie tělních tekutin je velmi komplikovaná právě kvůli nízké koncentraci chemických složek, zejména proteinů. Technika DCDR se proto může uplatnit zejména v medicíně při diagnostice různých nemocí, např. očních infekcí [42], či nemocí způsobující biochemické změny v mozku [43].

2.4.3. Konfokální mikroskopie

Obyčejný optický mikroskop soustřeďuje světlo z několika vrstev vzorku a tím vytváří neostrý obraz. Pomocí konfokálního mikroskopu se lze zbavit neostrotí v důsledku překrývání se zaostřeného obrazu s rozmazanými obrazy struktur, které se nacházejí mimo zaostřenou rovinu.

V konfokální mikroskopii je pozorovaný objekt osvětlen bodovým zdrojem, nejčastěji k tomu slouží laserový paprsek fokusovaný na clonku, která je pak objektivem mikroskopu zobrazena na vzorek do bodu o průměru rovnajícím se minimální vzdálenosti dvou rozlišitelných bodů. Stejný objektiv pak sbírá světlo vzorkem odražené a rozptýlené, případně fluorescenci. Při zpětném průchodu tohoto záření objektivem vznikne další obraz bodové clonky, který je pomocí děliče paprsků lokalizován před detektor. Na vzorku dochází k mnohonásobnému rozptylu a na detektor tak mohou dopadnout paprsky i z více vrstev, které leží mimo ohniskovou rovinu mikroskopu, proto se v místě tohoto obrazu nachází druhá konfokální bodová clonka, která blokuje detekci záření pocházejícího z míst vzorku mimo rovinu právě zaostřenou. Princip konfokálního mikroskopu je zobrazen na obr. 18.



Obr. 18: Princip konfokálního mikroskopu [44].

Nevýhodou konfokální mikroskopie je malé zorné pole. Obraz celé zaostřené roviny získáme rastrováním bod po bodu. Rastrovat může buď zaostřeným světlem přes pevný vzorek, nebo pohybovat vzorkem vzhledem k stacionárnímu zaostřenému svazku. Při rastrování je signál z detektoru registrován počítačem spolu s informací o souřadnicích analyzovaných bodů. Celý soubor těchto dat je pak převeden na obraz pozorovaného vzorku. Tento obraz již díky prostorové filtraci záření dopadajícího na detektor neobsahuje neostře pozadí mimofokálních oblastí vzorku.

Měřítkem konfokality mikroskopu je FWHM (full width at half maximum – šířka v polovině výšky) intenzitní křivky v závislosti na zaostření mikroskopu. Ta je funkcí apertury konfokální štěrby. Čím menší je konfokální štěrba, tím rychlejší je pokles intenzity při vzdalování od ohniska. Proto je konfokální zobrazení vždy kompromis mezi intenzitou signálu a rozlišením.

Konfokální mikroskop lze zkombinovat s Ramanovým spektrometrem. Na Oddělení fyziky biomolekul je integrovaný konfokální Ramanův systém HR 800 (viz. kapitola 4.1.1.), na kterém jsem měřila všechna Ramanova spektra. Tento systém umožňuje zaostřit se do požadované vrstvy vzorku a měřit Ramanovo spektrum pouze z této vrstvy, přičemž Ramanův signál pocházející z mimofokálních rovin je odstíněn.

3. Motivace

Ačkoli princip působení syntetických oligonukleotidů je známý a poměrně jednoduchý, přináší s sebou řadu překážek, které ztěžují přímou aplikaci těchto potenciálních léčiv v praxi. *in vivo* experimenty poskytují pouze nedostatečné a neprůkazné výsledky. Aby terapie byla úspěšná, je nutná vysoká specifita oligonukleotidové sekvence, stabilita v intracelulárním prostředí, ale také účinný transport oligonukleotidu do buňky, což je významný nedostatek při použití oligonukleotidů. Z tohoto důvodu se ve své diplomové práci zabývám schopností oligonukleotidů procházet buněčnou membránou. Na Oddělení fyziky biomolekul Fyzikálního Ústavu UK, kde vypracovávám svou diplomovou práci, jsou fyzikálně-chemické vlastnosti syntetických oligonukleotidů a jejich interakce s biomolekulami studovány hlavně pomocí spektroskopických a teoretických metod.

Hlavní motivací pro tuto diplomovou práci jsou experimenty provedené v laboratoři na Univerzitě Paříž 6, ve kterých byl jako podpůrný prostředek pro transport oligonukleotidů do buňky použit kationický porfyrin H_2TMPyP_4 a H_2TMAP . Interakce buněk a komplexu oligonukleotidů s porfyriny byla studována fluorescenčním mikroskopickým zobrazováním a časově rozlišenou mikrospektrofluorimetrií [45, 46]. Tyto fluorescenční metody však nepomohly objasnit mechanismus průniku oligonukleotidu skrz buněčnou membránu, proto se přešlo k modelovému systému studovanému pomocí Ramanovy spektroskopie. Ve své diplomové práci používám modelového systému unilamelárních vesikul, tzv. liposomů, a s použitím Ramanovy konfokální mikroskopie studuji jejich interakci s komplexem oligonukleotidu a porfyrinu.

4. Experimentální část

4.1. Popis aparatury

4.1.1. Integrovaný Ramanův systém HR 800

HR800 od firmy Horiba Jobin Yvon je integrovaný konfokální Ramanův systém, který používá uspořádání pro měření zpětného rozptylu. Podrobný popis aparatury je uveden v [47], schéma je znázorněno na obr. 19. Konfokální mikroskop je spojen se spektrometrem s ohniskovou vzdáleností 800 mm a dvěma vyměnitelnými difrakčními mřížkami.



Obr. 19: Schéma integrovaného Ramanova systému HR 800 [47].

Součástí systému je standardní Helium–Neonový laser (He–Ne) s výkonem 20 mW na výstupu. Svazek o vlnové délce $\lambda = 632,817$ nm prochází nejprve interferenčním filtrem, který nepropouští vedlejší plazmové čáry laseru. Laserový svazek je zaostřen pomocí čočky na štěrbinu H_1 , která tvoří prostorový filtr a určuje aperturu svazku před vstupem do mikroskopu. Dále je laserový svazek odražen zrcátkem $M8$ na Notch filtr potlačující elasticky rozptýlené záření. Notch filtr je holografická mřížka specifická pro jednu vlnovou délku, kterou pod daným úhlem úplně odráží, zatímco záření jiných vlnových délek propouští. Holografickou mřížkou je tedy svazek odražen a objektivem mikroskopu fokusován na vzorek, který můžeme sledovat TV kamerou pomocí dvou děličů svazku 50/50. Osvětlení

vzorku zajišťuje právě jeden z těchto děličů, který vede bílé světlo z optického vlákna na vzorek.

Rozptýlené záření je soustředěno na konfokální štěrbinu, která je pomocí čoček zobrazena na nastavitelnou vstupní štěrbinu spektrografu. Mezi vzorkem a konfokální štěrbinou dochází ke zvětšení obrazu, které je určeno zvětšením zdvojeného objektivu mikroskopu vynásobeného faktorem 1,4 daného konstrukcí mikroskopu. Spektrograf HR 800 umožňuje použít standardní mřížku s 1800 vrypy/mm nebo mřížku s 600 vrypy/mm. Rozlišení spektrografu závisí na disperzi, šířce vstupní štěrbinu a na velikosti jejího zobrazení na CCD detektoru chlazeným kapalným dusíkem. Rozlišení detektoru je 1024 × 256 bodů. V systému HR 800 je zabudovaný mikroskop BX40 (firma Olympus). K dispozici jsou objektivy: 10× NA 0.25, 50 × NA 0.7, 100× NA 0.9, 100× 1.00 W a 100× 1.25 OIL. Pro pozorování vzorků je mikroskop vybaven barevnou kamerou a pohyblivým stolkem.

4.1.2. UV/VIS absorpční spektrometr

Absorpční spektra byla měřena na spektrometru Perkin Elmer Lambda 12. Tento spektrometr je dvoupraprskový, jeden svazek paprsku prochází referencí a vstupuje do detektoru, druhý svazek prochází měřeným vzorkem. Jako zdroj záření slouží pro UV oblast deuteriová výbojka a pro viditelnou oblast halogenová lampa. Největší možný spektrální rozsah je 190 - 1100 nm a spektrální rozlišení spektrometru činí 2 nm.

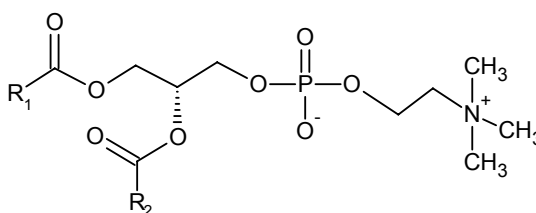
4.2. Použité látky

Oligonukleotid: Plně modifikovaný fosforothioátový oligonukleotid s délkou 15 thyminových bazí (dT₁₅) byl na zakázku syntetizován na Oddělení funkční genomiky Masarykovy univerzity v Brně.

Porfyrin: Cu²⁺ 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphine - CuTMPyP₄ byl poskytnut prof. V. Králem z Ústavu analytické chemie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze.

Lipidy: Na přípravu liposomů při studiu transportu oligonukleotidů skrz liposomální membránu jsem použila dva druhy fosfolipidů. Liposomy jsem při prvotních experimentech připravovala ze směsi fosfolipidů získaných ze sojových bobů (Asolectin) od firmy Fluka. Tato směs obsahuje minimálně 25%

fosfatidylcholinu (PC). Pro další experimenty jsem používala čistý 1,2–diacyl-sn-glycero-3-fosfocholin (obr. 20) izolovaný z vaječného žloutku (Sigma-Aldrich). Obecně tento fosfatidylcholin obsahuje mastné kyseliny přibližně v tomto zastoupení: 33% kyselina palmitová (16:0), 13% kyselina stearová (18:0), 31% kyselina olejová (18:1) a 15% kyselina linoleová (18:2). Ostatní mastné kyseliny jsou zastoupeny v malém množství. Průměrná molekulární váha daná zmíněnými mastnými kyselinami činí přibližně 768. Fosfatidylcholin byl uchováván při teplotě -18°C .



Obr. 20: 1,2–diacyl-sn-glycero-3-fosfocholin – R₁, R₂ značí uhlovodíkové řetězce mastných kyselin.

Pro měření byly připraveny pufované roztoky oligonukleotidů, porfyrinu i lipidů. Pro experimenty probíhající na podložním sklíčku byl připraven 50 mM pufr TRIS, jehož pH bylo nastaveno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 7,37. Pro DCDR spektroskopii byly vzorky rozpuštěny v 20 mM fosfátovém pufru (připraveného smícháním KH_2PO_4 a K_2HPO_4). Hodnota pH byla přidáním NaOH nastavena na hodnotu 7,51.

4.3. Příprava vzorků

4.3.1. Příprava jednovrstevných liposomů

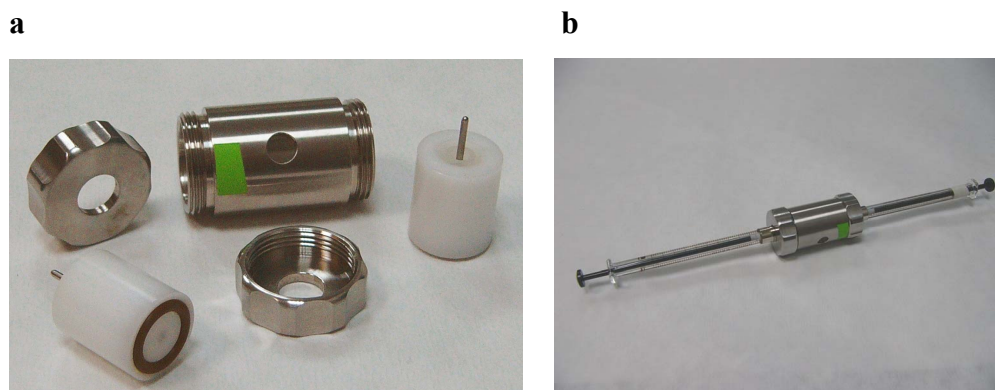
Nejprve jsem připravila velké mnohovrstevné liposomy [48] a z nich jsem protlačováním přes polykarbonátové membrány pomocí zařízení Liposofast-BasicTM (Avestin, Inc.) připravila jednovrstevné liposomy.

Na analytických vahách jsem ve skleněné nádobce navážila fosfolipid, který jsem pak rozpustila v malém množství chloroformu. Poté jsem rozpouštědlo odpařila proudem stlačeného dusíku při pokojové teplotě tak, aby na stěně nádoby vznikla tenká vrstva fosfolipidu. Toho jsem docílila kontinuálním otáčením nádoby při odpařování rozpouštědla.

Po úplném odstranění zbytků chloroformu jsem do skleněné nádoby přidala pufr. V případě vzniklých shluků bylo zapotřebí tenký lipidový film protřepat, ale většinou se vrstva fosfolipidu v daném pufru dobře rozpouštěla. Tímto způsobem byl připraven roztok mnohvrstevných vesikulů různé velikosti. Výsledná koncentrace lipidů byla 1,3 mM.

Homogenní suspenzi liposomů požadované velikosti jsem získala protlačováním roztoku fosfolipidů přes membránu s požadovanou velikostí pórů použitím zařízení Liposofast-Basic™, které je znázorněno na obr. 21. Zvolená membrána se vkládá na gumový „O“-kroužek prvního teflonového válečku, který je zasunut do krytu. Druhý teflonový váleček se přidá do krytu tak, aby „O“-kroužky byly vidět pozorovacím otvorem. Válečky se k sobě stlačí ručním utáhnutím šroubového uzávěru tak, aby nedošlo k protržení filtru. Do držáku filtrů se zatlačí a současně jemně zašroubují speciální Hamilton stříkačky o objemu 500 µl, pomocí nichž se liposomy protlačují přes polykarbonátovou membránu. Roztok liposomů se nasaje do označené stříkačky a poté se několikrát protlačí přes membránu, důležitý je lichý počet filtrací, aby se případné větší agregáty nedostaly do připravovaného vzorku.

Před přípravou jednovrstevných liposomů jsem zařízení Liposofast-Basic™ dokonale vyčistila etanolem a silně zředěnou HCl. Pro výrobu liposomů jsem použila membrány s póry o velikosti 400 nm a roztok jsem protlačila 19krát. Tímto způsobem jsem získala požadovanou homogenní suspenzi liposomů o velikosti 400 nm s výslednou koncentrací lipidů 1,3 mM.



Obr. 21: Zařízení Liposofast-Basic™ (Avestin, Inc.). **a** – hlavní součásti: držák filtru (dva bílé teflonové válečky s gumovými „O“-kroužky), dva šroubové uzávěry a kryt s otvorem. **b** – pohled na zkompletované zařízení.

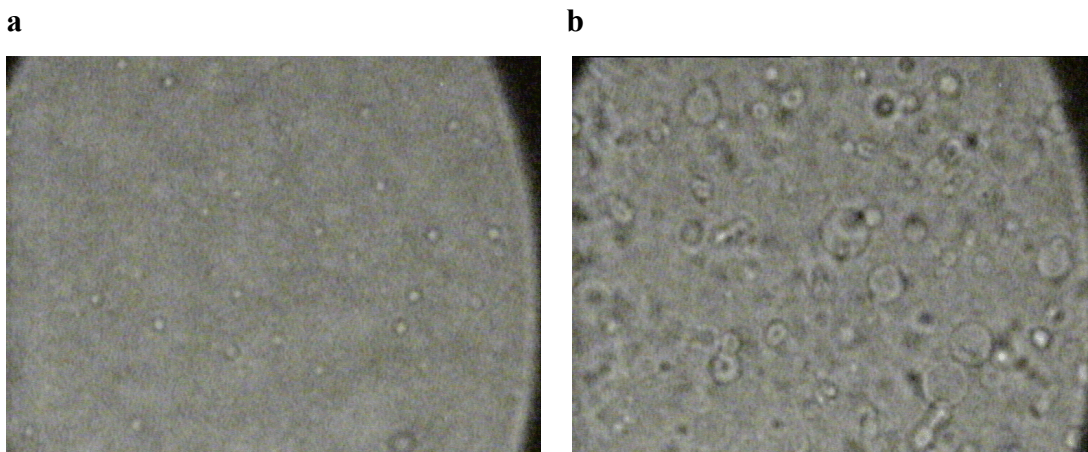
4.3.2. Příprava vzorků na podložním sklíčku

V experimentech pro optimalizaci získávání Ramanových spekter byla použita nehomogenní suspenze liposomů s širokou distribucí velikostí částic. Tenká vrstva lipidů byla pouze rozpuštěna v pufru a silně protřepána. Vzorky nanášené na podložní sklíčko byly připravovány dvěma způsoby:

1. Na podložní sklíčko jsem napipetovala 3 μl vzorku a opatrně přiklopila krycím sklíčkem, čímž vznikla slabá vrstva vzorku o tloušťce přibližně 10 μm . Důležité je, aby krycí sklíčko bylo dobře zafixováno. V opačném případě se liposomy v suspenzi rychle pohybovaly a nebylo možné je mikroskopem přesně zaměřit a poté změřit jejich spektrum. I při měření spekter pevně fixovaných vzorků se objevily experimentální potíže. Díky velmi slabé vrstvě vzorku se liposomy vyskytují v bezprostřední blízkosti spodního sklíčka a při akumulaci Ramanova signálu liposomů se v jejich spektrech objevuje signál pocházející právě od tohoto skla. Z těchto důvodů jsem zvolila alternativní metodu fixování vzorku.

2. Abych dosáhla větší tloušťky vzorku, zafixovala jsem na podložní sklíčko nejprve dvě krycí sklíčka tak, abych mezi ně mohla napipetovat 3 μl vzorku. Jejich adheze jsem docílila přikápnutím malého množství vody, která se nasála pod sklíčko. Vzorek jsem opět přiklopila krycím sklíčkem, které zároveň leželo na obou fixovaných sklíčkách, které tak tvořily „spacer“. Připravený vzorek měl tloušťku přibližně 150 μm . Jak je vidět na obr. 22 v horní vrstvě suspenze liposomů (Obr. 22a) připravených touto metodou se objevují převážně menší liposomy, zatímco v dolní vrstvě (obr. 22b) se usazují větší liposomy. Tato distribuce liposomů je dána jejich hmotností.

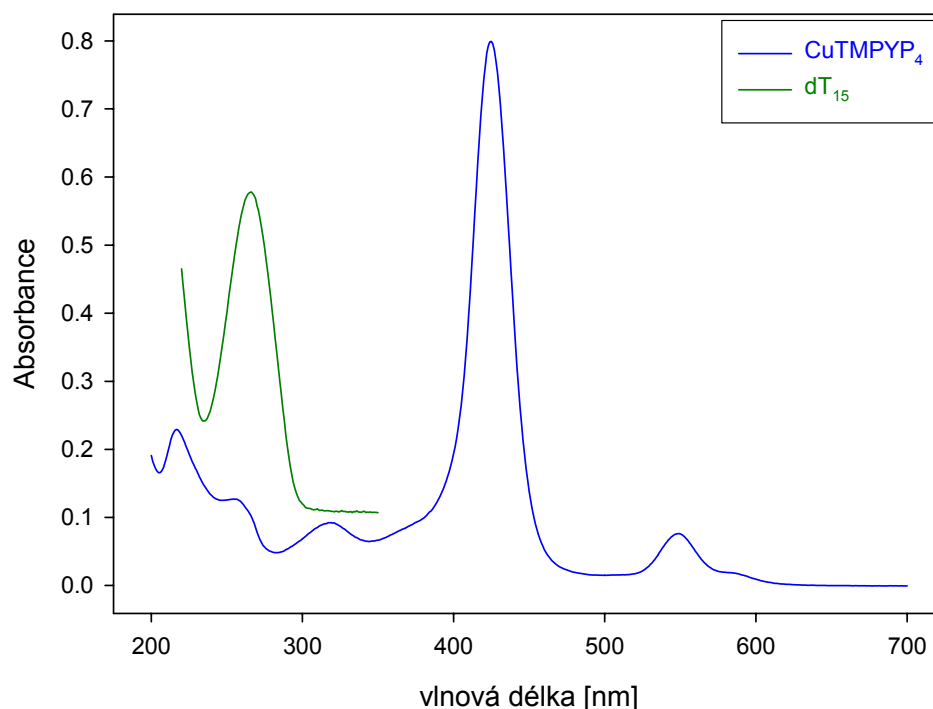
Vzhledem ke snazší manipulaci se vzorkem byly všechny studované vzorky připravovány a proměřeny druhou metodou.



Obr. 22: Snímky z mikroskopu ukazující distribuci liposomů v horní vrstvě vzorku (a) a v dolní vrstvě vzorku (b).

4.3.3. Příprava vzorků oligonukleotidu a porfyriu

Absorpční spektra oligonukleotidu dT_{15} a porfyriu $CuTMPyP_4$ byla zaznamenávána rychlostí 240 nm/min a probíhala v různém spektrálním rozsahu. Vzorek dT_{15} byl měřen v rozsahu 220 - 350 nm, kationický porfyrin $CuTMPyP_4$ byl proměřen v rozsahu 200 - 700 nm. Ve spektrální oblasti UV záření je nutné používat křemenné kyvety, proto měření probíhala v těchto kyvetách o průřezu 1x10 mm. Absorpční spektra obou měřených látek jsou znázorněna v grafu na obr. 23. Koncentrace porfyriu byla určována z absorbance Soretova pásu na 425 nm. Koncentrace oligonukleotidu byla stanovena z měření absorbance na 260 nm (pro korekci na nulovou hladinu byla odečítána absorbance při 320 nm, kde nukleové kyseliny již neabsorbují). Výsledné koncentrace byly vypočítány podle rovnice (6). Příslušné extinkční koeficienty ε jsou uvedeny v tabulce 1.



Obr 23: Absorpční spektrum porfyriu CuTMPyP₄ a oligonukleotidu dT₁₅.

Tabulka 1: Extinkční koeficienty oligonukleotidu a porfyriu.

Látka	dT ₁₅	CuTMPyP ₄
ϵ [cm ⁻¹ M ⁻¹]	122 100	231 000

4.4. Zpracování výsledků

4.4.1. Faktorová analýza

Faktorová analýza (FA) využívající algoritmus SVD (singular value decomposition) je statistická metoda, která umožňuje charakterizovat objemné série dat pomocí několika málo společných faktorů a tím snížit dimenzi experimentálních dat bez ztráty užitečné informace [49]. Algoritmus FA hledá rozklad naměřených spekter do báze vzájemně ortogonálních spektrálních průběhů (subspekter), které seřadí podle jejich statistické váhy (W_j). Každé původní spektrum $Y_i(\nu)$ lze pak vyjádřit vztahem:

$$Y_i(\nu) = \sum_{j=1}^N W_j V_{ij} S_j(\nu), \quad (10)$$

kde W_j jsou singulární čísla udávající statistickou váhu subspektra S_j a V_{ij} jsou unitární matice koeficientů, jejíž prvky vystihují relativní podíl subspekter v jednotlivých experimentálních spektrech.

Pomocí FA lze určit počet nezávislých složek uplatňujících se ve spektrech (tzv. faktorová dimenze spekter) z klesajících hodnot W_j , což je jedním z důvodů pro její používání. U subspekter s velmi malou hodnotou W_j předpokládáme, že se jejich příspěvek ve spektrech v podstatě neuplatňuje, tedy nenese žádnou relevantní informaci. Naměřená spektra pak lze zrekonstruovat pomocí vztahu:

$$Y_i(\nu) \approx \sum_{j=1}^M W_j V_{ij} S_j(\nu), \quad (11)$$

kde $M < N$ udává faktorovou dimenzi.

Faktorová dimenze se zvětší, pokud jednotlivá spektra obsahují různé artefakty (např. změny spektrálního pozadí dané výskytem fluorescence, spektrální příspěvky pocházející od stop nečistot, nebo posun kalibrace x-ové osy). Proto je důležité naměřená spektra před aplikací FA nejdříve částečně zpracovat. V případě výskytu fluorescence je potřeba odečíst fluorescenční pozadí. Pozadí se proloží vhodnou křivkou, např. polynomickou funkcí, což lze provést manuálně, ale je zde vysoké riziko subjektivní chyby. Vhodnější je použití sofistikovanějších algoritmů, např. metodu ortogonálních diferencí.

4.4.2. Metoda ortogonálních diferencí

Metoda ortogonálních diferencí je metoda vyvinutá na Oddělení fyziky biomolekul, jejíž princip je popsán např. v [50].

Spektra jsou chápána jako vektory o dimenzi odpovídající počtu spektrálních bodů. Míra podobnosti spekter může být vyjádřena jejich skalárním součinem. Pokud je skalární součin roven nule, jsou spektra na sobě nezávislá. Metoda je založena na transformaci původních spekter na jejich ortogonální doplňky dle rovnice:

$$Y_{dopl}(\nu) = Y(\nu) - Y_o(\nu) \frac{\langle Y(\nu) \cdot Y_o(\nu) \rangle}{\langle Y_o(\nu) \cdot Y_o(\nu) \rangle}, \quad (12)$$

kde $Y(\nu)$ je původní spektrum a $Y_{dopl}(\nu)$ je ortogonální doplněk k $Y_o(\nu)$. $Y_o(\nu)$ tvoří bázi vzájemně ortogonálních vektorů, lomené závorky značí skalární součin. Výsledkem této procedury je sada spekter s odečtenými profily obsaženými v ortogonální bázi. Vektorem ortogonální báze mohou být polynomy libovolného stupně, stejně tak nežádoucí spektrální profily. Pro odečtení fluorescenčního pozadí obvykle stačí polynom 5. až 6. stupně.

5. Experimentální výsledky

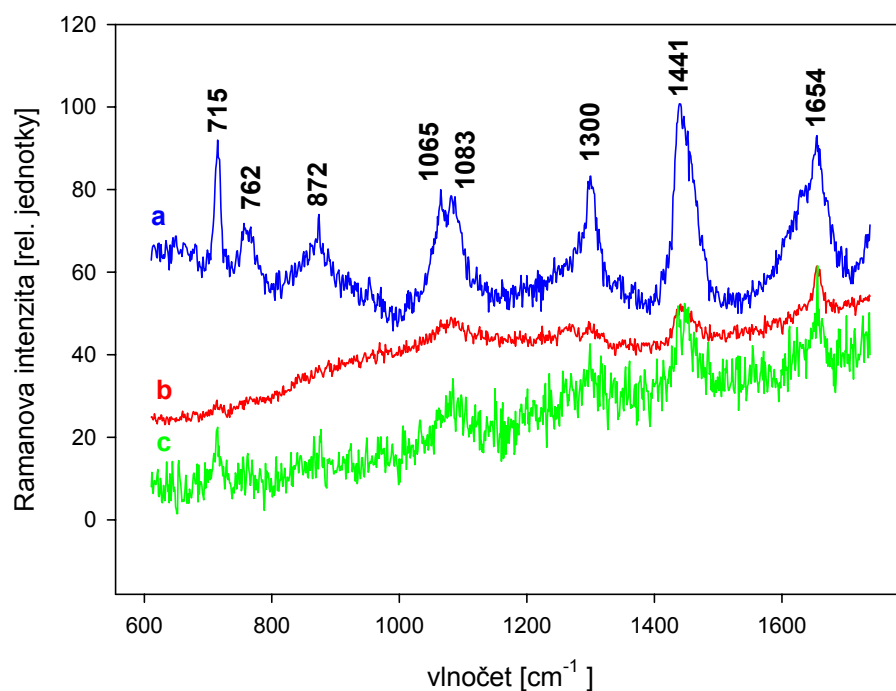
Všechna měření byla prováděna s následujícím nastavením integrovaného Ramanova mikroskopu. Šířka konfokální štěrbinu byla 400 μm a vstupní štěrbinu spektrometru byla nastavena na 100 μm . Měření byla prováděna při teplotě 18 $^{\circ}\text{C}$, vzorky byly excitovány vlnovou délkou 632,817 nm He-Ne laserem.

5.1. Měření vzorků na podložním sklíčku

Vzorky byly rozpuštěny v 50 mM pufru TRIS. Byla proměřena spektra liposomů, kationického porfyriu a jejich komplexu.

5.1.1. Liposomy

Liposomy byly připraveny výše uvedeným způsobem s konečnou koncentrací lipidu přibližně 9,7 mM. Pro počáteční experimenty jsem vyrobila a proměřila Ramanova spektra liposomů připravená z Asolectinu. Na obr. 24b je vidět změřené spektrum Asolectinu s výrazným fluorescenčním pozadím. Domnívala jsme se, že fluorescence je způsobena znečištěním samotného Asolectinu, proto jsem v dalších experimentech používala pro přípravu liposomů 1,2–diacyl-sn-glycero-3-fosfocholin. Fluorescenční pozadí se přesto objevilo i ve spektrech těchto liposomů (obr.24c), proto jsem důkladně vyčistila zařízení Liposofast-Basic™. Vzhledem k tomu, že následně změřená spektra liposomů byla bez výrazného fluorescenčního pozadí (obr. 24a), usuzuji, že původ tohoto pozadí byl ve znečištění zařízení Liposofast-Basic™.



Obr. 24: a) změřené spektrum 1,2–diacyl–sn–glycero–3–fosfocholinu, signál byl akumulován 300 s. b) změřené spectrum Asolectinu, signál byl akumulován 300 s. c) změřené spektrum 1,2–diacyl–sn–glycero–3–fosfocholinu s výrazným fluorescenčním pozadím, signál byl akumulován 600 s.

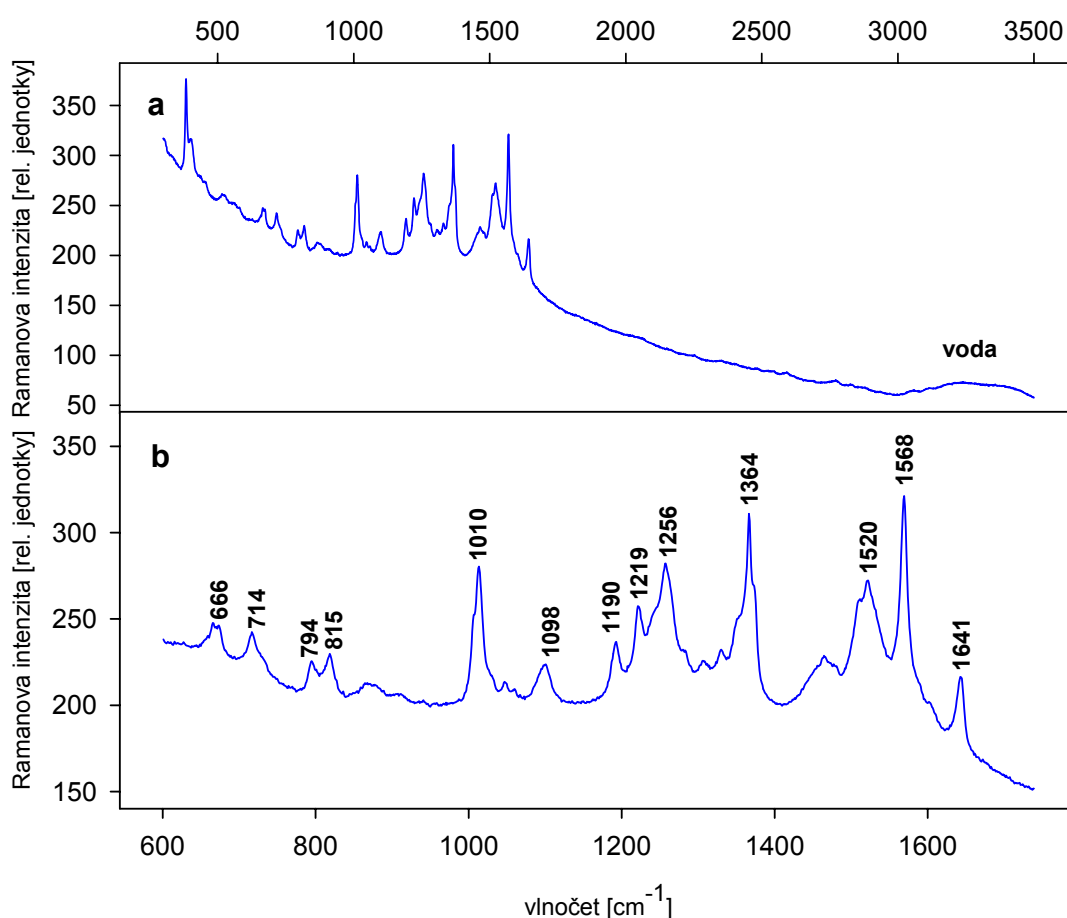
Ve spektru 1,2–diacyl–sn–glycero–3–fosfocholinu v grafu na obr. 24a byly výrazné pásy označeny příslušnými vlnočty. Pás 715 cm^{-1} odpovídá C–N valenční vibraci hlavičky fosfolipidu. Pás 1083 cm^{-1} byl přiřazen C–C valenční vibraci v gauche konformaci. Pás 1300 cm^{-1} odpovídá CH_2 deformační – twisting vibraci v uhlovodíkovém řetězci fosfolipidů. Silný pás 1441 cm^{-1} odpovídá CH_2 deformační vibraci v uhlovodíkovém řetězci fosfolipidů a pás 1656 cm^{-1} byl přiřazen cis C=C valenční vibraci [51, 52].

Spektra připravených liposomů byla několikrát proměřena s odstupem času a v jejich spektrech nebyly pozorovány žádné změny ani několik týdnů po přípravě.

5.1.2. Porfyrin CuTMPyP_4

Při sledování vstupu oligonukleotidu do buňky pozorovaného fluorescenční mikroskopií byl použit v transfekční proceduře nemetalovaný porfyrin H_2TMPyP . Nejenže usnadňuje průnik oligonukleotidu skrz buněčnou membránu, ale zároveň

slouží jako fluorescenční marker. H_2TMPyP_4 vykazuje fluorescenci, díky které můžeme fluorescenčními technikami sledovat jeho distribuci uvnitř buňky. V Ramanově spektroskopii je však fluorescence porfyriu nežádoucí, protože bez zbytku překryje Ramanovo spektrum, proto jsem použila jeho metalovanou formu $CuTMPyP_4$, která nevykazuje fluorescenci. Ramanův spektrální profil $CuTMPyP_4$ s koncentrací 3,46 mM změřený v rozsahu $400 - 3500\text{ cm}^{-1}$ je uveden na obr. 25a, pás okolo 3300 cm^{-1} odpovídá signálu vody. Na obr. 25b je detail spektrálního intervalu $600 - 1730\text{ cm}^{-1}$ s vyznačenou polohou intenzivních pásů.



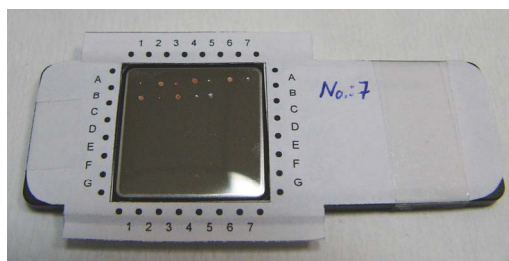
Obr. 25: Spektrum porfyriu $CuTMPyP_4$ s koncentrací 3,46 mM měřené ve spektrálním rozsahu $400 - 3500\text{ cm}^{-1}$ (a) a detail předešlého spektra v rozsahu $600 - 1730\text{ cm}^{-1}$ (b). Signál byl akumulován 15 min.

Smícháním suspenze liposomů s roztokem porfyriu jsem vytvořila komplex o výsledné koncentraci lipidů 8,4 mM a koncentraci porfyriu 0,5 mM. Ve spektrech komplexu nebyl pozorován nárůst fluorescenčního pozadí, ale ve spektrálním rozsahu 600-1750 cm^{-1} je spektrální profil liposomů překryt spektrem porfyriu.

5.2. Měření vzorků DCDR technikou

Vzorky byly rozpuštěny v 20 mM fosfátovém pufru. Byla proměřena spektra liposomů, porfyriu, oligonukleotidu dT₁₅ a jejich komplexů. Lipidy byly připraveny s koncentrací 1,3mM, koncentrace porfyriu byla stanovena absorpční spektroskopii na 1,46 mM a koncentrace oligonukleotidů byla stanovena na 1,2 mM. Měření bylo ověřeno, že destička Tienta Sciences - SpectRIM™ nevykazuje Ramanův signál. Na obr. 26 je vidět destička s nanesenými kapkami vzorků, kterou jsem používala v experimentu.

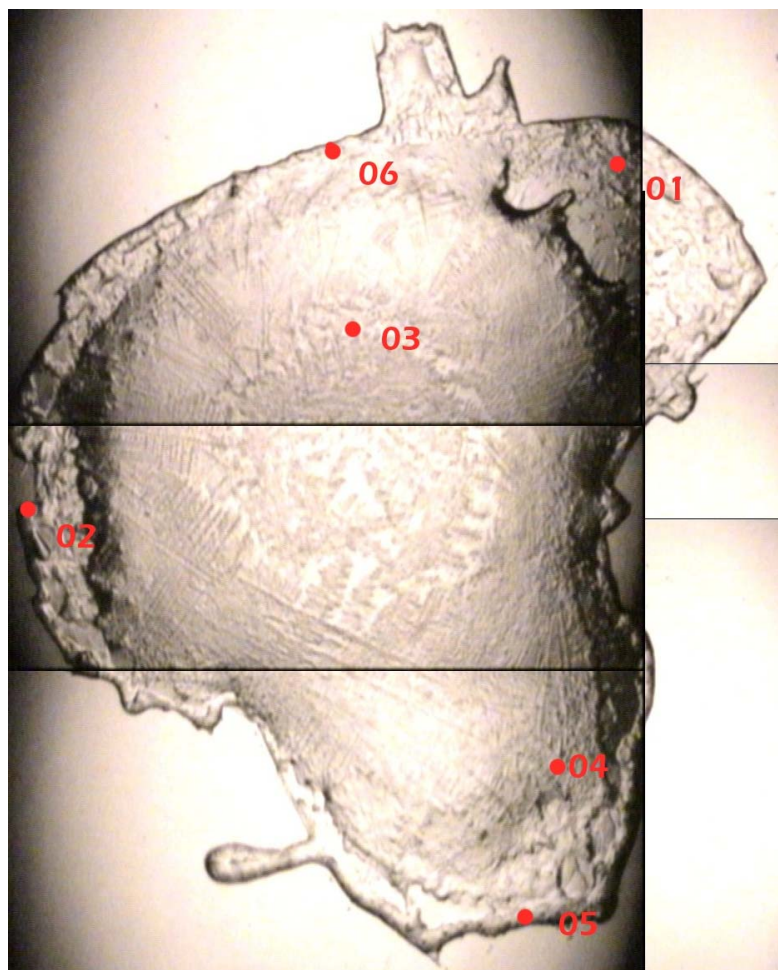
Cílem měření provedených technikou DCDR bylo zjistit změny spektrálního profilu směsi liposomů s komplexem oligonukleotidů a porfyriu v časovém rozmezí 24 hodin, postup její přípravy je podrobně uveden v kapitole 5.2.3. V připravené směsi byla koncentrace lipidů 0,43 mM, porfyriu 0,07 mM a oligonukleotidu 0,11 mM. Ihned po přípravě byla nanesena na destičku první kapka vzorku, další kapky byly naneseny s časovým odstupem 1, 2, 4, 8 a 24 hodin od přípravy. Všechny kapky vysychaly při teplotě 18 °C po dobu přibližně 60 minut. Po důkladném vyschnutí kapek byla změřena jejich Ramanova spektra objektivem 50x.



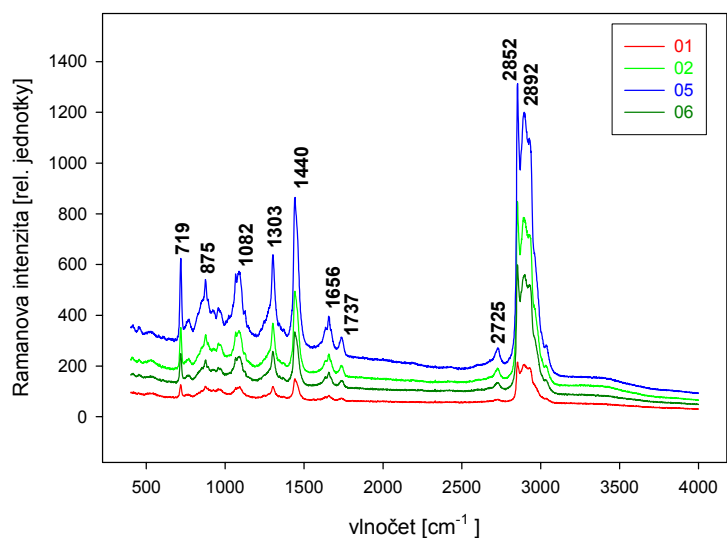
Obr. 26: Destička Tienta Sciences - SpectRIM™ používaná v experimentu. Tečky viditelné na teflonovém povrchu jsou kapky směsi nanášené s časovým odstupem 0, 1, 2, 4, 8 a 24 hodin po přípravě směsi.

5.2.1. Liposomy

Metodou DCDR jsem naměřila velmi kvalitní spektra liposomů s 10krát menší koncentrací lipidů než při měření na podložním sklíčku. Na obr. 27 je vidět kapka liposomů po vyschnutí snímaná objektivem 10×. Z obr. 27 je patrné, že při vysychání kapky suspenze liposomů došlo k oddělení složek vzorku. V centrální části kapky lze pozorovat jemnou strukturu vykrystalizovaného rozpouštědla. Část vzorku se akumulovala podél okraje kapky. Z míst vyznačených na obr. 27 červenými body a označených čísly byl sbírán Ramanův signál. Body 01, 02, 05 a 06 leží v okrajové části kapky, jejich naměřená spektra jsou v grafu na obr. 28. Spektra z bodů 03 a 04 z vnitřku kapky jsou uvedena v grafu na obr. 29.

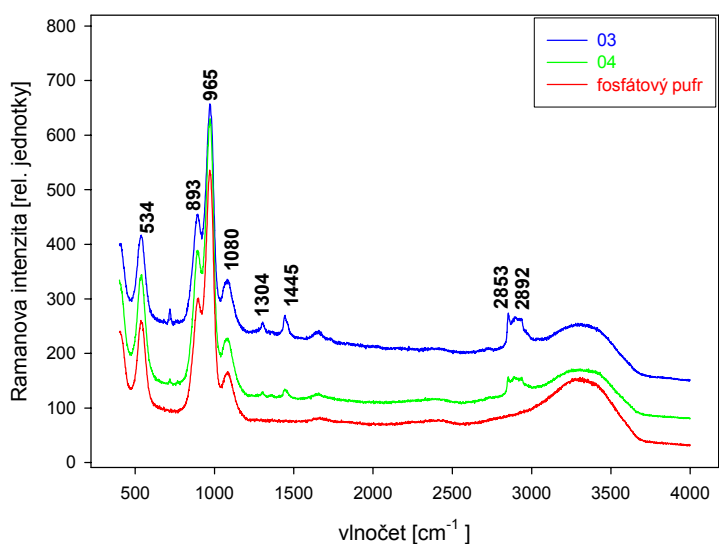


Obr. 27: Kapka suspenze liposomů po úplném vyschnutí. Červené body označené čísly určují místa, odkud byl sbírán signál. Body 01, 02, 05 a 06 leží v okrajové části kapky, zatímco body 03 a 04 leží ve vnitřku kapky.



Obr. 28: Naměřená Ramanova spektra z bodů 01, 02, 05 a 06 na okraji vyschlé kapky, doba akumulace signálu byla 200 s.

Z grafu na obr. 28 je vidět, že změřená Ramanova spektra bodů 01, 02, 05 a 06 z okraje kapky si jsou podobná a intenzivní pásy odpovídají spektrálnímu profilu liposomů – viz. obr. 24. Pásky 2852 a 2892 cm^{-1} přísluší $-\text{CH}_2$ symetrické a asymetrické valenční vibraci 1,2–diacyl-sn-glycero-3-fosfocholinu [51].



Obr. 29: Naměřená spektra bodů 03 a 04 z vnitřku kapky liposomů a změřené spektrum 20 mM fosfátového pufru, doba akumulace signálu byla 200 s.

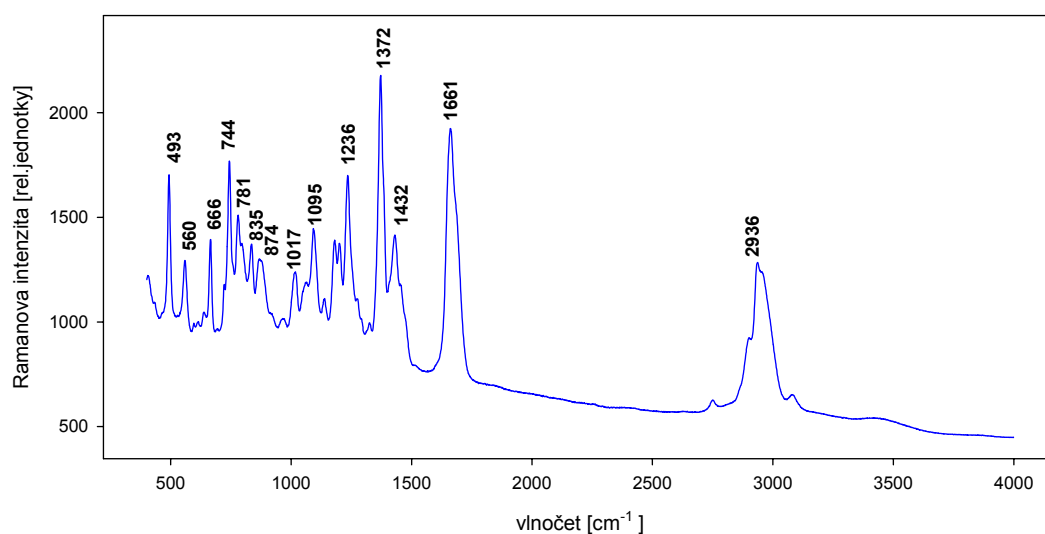
Z grafu na obr. 29 je vidět, že nejintenzivnější pásy ve spektrech z bodů 03 a 04 ležících uvnitř kapky odpovídají spektrálnímu profilu fosfátového pufru. V jejich spektrech se objevuje ještě několik slabších pásů. Pás okolo 3300 cm^{-1} odpovídá vibracím vody, zbylé pásy lze přiřadit spektrálnímu profilu liposomů. V bodě 03 jsou tyto pásy intenzivnější, což ukazuje na vyšší koncentraci liposomů v tomto místě.

Z obr. 28 a 29 lze prokázat vykrytalizování fosfátového pufru uvnitř kapky a zkoncentrování liposomů při jejím okraji.

5.2.2. Komplex oligonukleotidu a porfyriu

V připraveném komplexu oligonukleotidu dT_{15} s porfyriem $CuTMPyP_4$ připadaly 2 porfyryny na 3 molekuly oligonukleotidu dT_{15} . Změřené spektrum kapky oligonukleotidu dT_{15} s koncentrací 1,2 mM je znázorněno v grafu na obr. 30.

Požadovaného poměru porfyriu a oligonukleotidu bylo dosaženo smícháním 0,29 mM $CuTMPyP_4$ a 1,24 mM dT_{15} v poměru 1:2.



Obr. 30: Spektrum oligonukleotidu dT_{15} . Akumulace signálu 10 min.

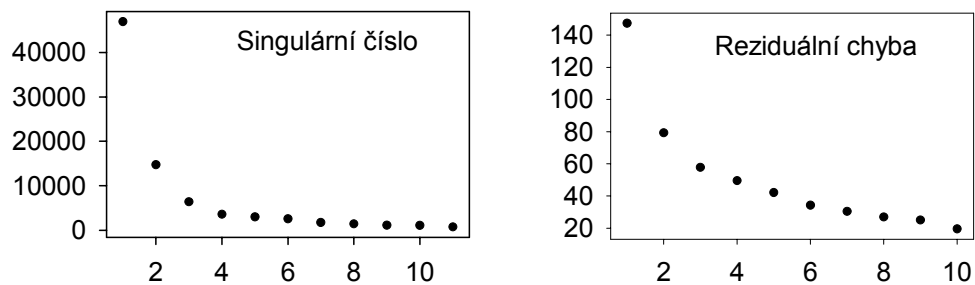
V důsledku interakce oligonukleotidu s porfyriem dochází k nárůstu fluorescenčního pozadí v roztoku na podložním skle (spektrum neuvádím) i ve vysychající kapce. Vzhledem k tomu, že k tomuto nárůstu dochází i na podložním skle, lze usuzovat, že tento nárůst nelze spojovat ani s procesem vysychání kapky ani s případnou interakcí s povrchem DCDR destičky. Kvůli tomuto pozadí jsou ve

spektru komplexu pozorovatelné jen silné pásy porfyriu, subtilnější pásy jsou zcela překryty fluorescenčním pozadím. Předpokládám, že toto pozadí není způsobeno vyvázáním mědi (demetalací) CuTMPyP_4 , protože změřené maximum fluorescenčního pozadí leží v oblasti 2500 cm^{-1} , což při dané excitační vlnové délce odpovídá 752 nm. Na této vlnové délce má emisní maximum metalovaný porfyrinu CuTMPyP_4 [38]. Maximum emise nemetalované formy porfyriu (H_2TMPyP_4) leží okolo 720 nm [53]. Markerem nepřítomnosti atomu mědi v porfyrinovém kruhu je i Ramanův pás v poloze 330 cm^{-1} , který však nebyl pozorován (spektrum neuvádím).

Podobný nárůst fluorescence byl pozorován při interakci CuTMPyP_4 s DNA [54]. CuTMPyP_4 ve vodném prostředí nevykazuje fluorescenci, protože ta je zhasena vodou tvořící s porfyrinem komplex, ale po přidání DNA se objeví emisní signál, jehož intenzita závisí na složení párů bází. DNA bohatá na páry GC inhibuje zhasení fluorescence více než systém $[\text{poly}(\text{dA-dT})]_2$, u kterého byla pozorována jen velmi slabá, na poměru koncentrace porfyriu a nukleové kyseliny nezávislá emise. Inhibice zhasení fluorescence je v souladu s pozorováním, že porfyrin interkaluje mezi páry bází DNA, čímž je znemožněn přístup vody k molekule porfyriu, která zhasí fluorescenci CuTMPyP_4 . Zhasení fluorescence pozorované u systému $[\text{poly}(\text{dA-dT})]_2$ je spojeno s navázáním porfyriu do žlábků DNA, kdy je vytvořen komplex mezi porfyrinem a thyminem. Místo molekul vody zde jako zhaselo fluorescence působí skupina C=O náležící thyminu. Z této studie plyne, že typ vazby porfyriu na nukleovou kyselinu závisí na jejím bazovém složení.

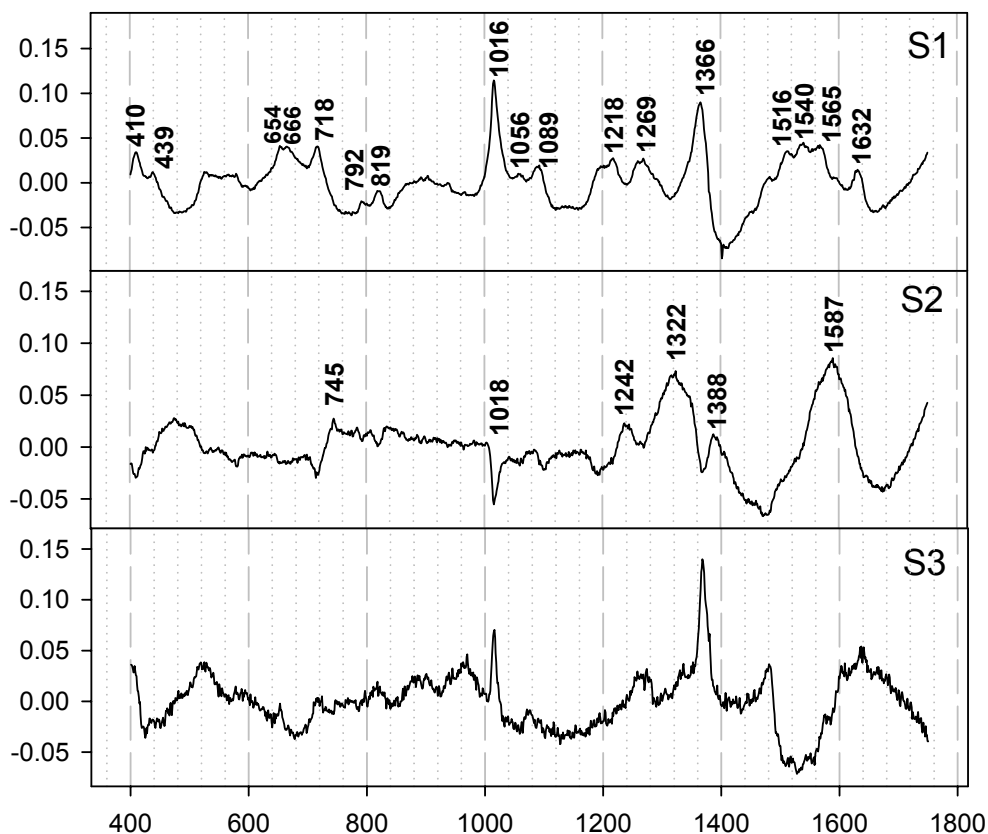
V našem případě byla naměřena spektra komplexu oligonukleotidu dT_{15} s porfyrinem CuTMPyP_4 s fluorescenčním pozadím, které není příliš vysoké. Pokud by došlo k enormnímu nárůstu fluorescence, nebylo by ve spektrech komplexu možné pozorovat žádný Ramanův signál.

Malá množství vzorku komplexu oligonukleotidu a porfyrinem ($2\mu\text{l}$) byla nanášena na destičku v časovém intervalu 0, 1, 2, 4, 8 a 24 hodin od přípravy vzorku. Po vyschnutí kapek komplexu byl změřen jejich Ramanův signál, z každé kapky bylo vybráno několik charakteristických spekter, čímž jsem získala sérii spekter jako časovou závislost, která byla dále zpracována metodou ortogonálních diferencí (více v kapitole 5.2.3.). Na tuto sérii byla posléze aplikována faktorová analýza, jejíž výsledky jsou v grafech níže.

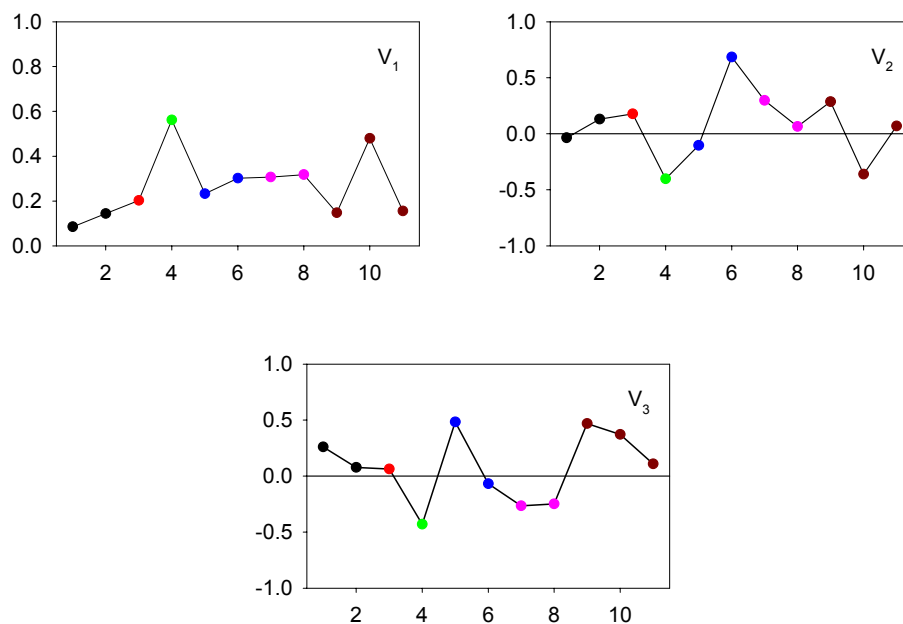


Obr. 31: Singulární číslo a reziduální chyba pro sérii 11 spekter komplexu.

Z reziduální chyby lze určit, jaké chyby se dopustíme, pokud vezmeme v úvahu pouze jedno subspektrum, resp. 2, 3 atd. Z hodnot singulárního čísla a reziduální chyby lze usoudit, že faktorová dimenze série spekter je rovna dvěma, protože hodnota třetího singulárního čísla je vůči prvním dvěma podstatně menší. Pro ilustraci jsou v grafech na obrázku 32 uvedena první tři subspektra.



Obr. 32. První tři subspektra série spekter kapek komplexu nanášených v časovém intervalu 0-24 hodin.



Obr. 33: Hodnoty koeficientů V_1 , V_2 , a V_3 .

Koeficienty příslušející jedné kapce jsou vždy označeny stejnou barvou. Černá barva odpovídá kapce směsi nakápnuté ihned po její přípravě, červená barva náleží kapce nakápnuté 1 hodinu po přípravě. Zelená barva odpovídá časovému intervalu 2 hodiny, modrá barva odpovídá intervalu 4 hodiny, růžová barva odpovídá intervalu 8 hodin a hnědá barva odpovídá kapce směsi nakápnuté po 24 hodinách.

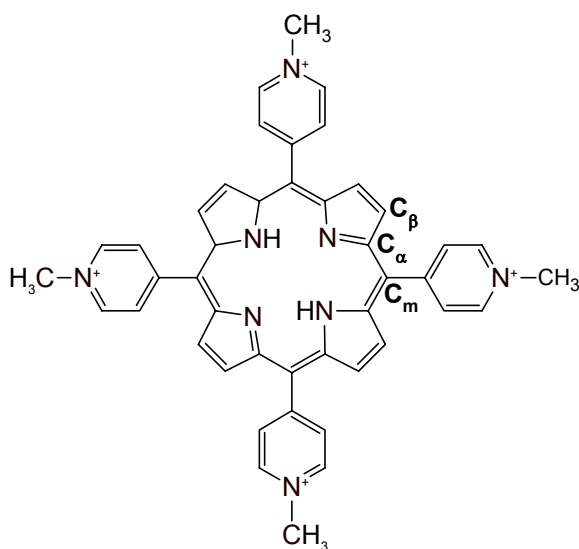
První subspektrum představuje průměrný spektrální profil vyskytující se ve všech spektrech. Hodnoty koeficientů V_1 určují zastoupení tohoto subspektra v sérii změřených spekter. V práci McMillina D. a McNett K. [54] bylo ukázáno, že interkalace porfyriu mezi baze DNA je preferována v oblastech s GC páry, zatímco oblasti s AT páry jsou vhodnější pro vazbu do žlábků DNA. Ve studii Kruglika a kol. [55] byly navíc jednotlivým typům interakcí přiřazeny charakteristické projevy ve spektrech. Tato měření byla prováděna kontinuálním laserem s excitací v Soretově pásu (441,6 nm), docházelo tedy k rezonančnímu zesílení Ramanova rozptylu. Podle jejich měření typ vazby porfyriu CuTMPyP_4 na DNA ovlivňuje Ramanův spektrální profil dvěma způsoby. Prvním z nich je poloha pásu na 1100 cm^{-1} , která je citlivá na interkalaci porfyriu. Při interakci s $[\text{poly (dG-dC)}]_2$ byl pozorován posuv na 1105 až 1106 cm^{-1} . Tento pás lze přiřadit $\delta(\text{C}_\beta\text{-H})$ deformaci, která odpovídá změně dihedrálního úhlu mezi N-methylpyridinovou skupinou a rovinou porfyriu při interkalaci [56]. Uhlíky C_α , C_β a C_m příslušející různým typům vibrací jsou

vyznačeny na obr. 34. Při interakci s [poly (dA-dT)]₂ k tomuto posuvu nedochází. Druhým projevem je rozdílný poměr intenzit dvou Ramanových pásů, které odpovídají vibracím porfyrinového kruhu ν_2 na 1570 cm⁻¹ (C_β-C_β valenční vibrace) a ν_4 na 1365 cm⁻¹ (C_α-N valenční vibrace) [56]. Poměr těchto pásů byl přibližně roven jedné pro volný porfyrin nebo porfyrin vázaný na oblast nukleové kyseliny bohaté na AT páry do žlábků. V případě interkalace porfyrinu dochází ke zvýšení intenzity pásů na 1570 cm⁻¹ a poměr obou pásů je roven přibližně 0,70.

V obr. 25 ukazující Ramanovo spektrum porfyrinu CuTMPyP₄ byl pás na 1098 cm⁻¹ přiřazen δ (C_β-H) deformaci, vibracím porfyrinového kruhu ν_2 a ν_4 byly přiřazeny pásy 1568 cm⁻¹ a 1364 cm⁻¹. Z prvního subspektra (obr. 32) lze vidět, že došlo k výraznému poklesu intenzity pásů odpovídajícího vibraci ν_2 na 1565 cm⁻¹ oproti spektru porfyrinu (obr. 25, pás 1568 cm⁻¹).

Druhé subspektrum má diferenční charakter a propisují se do něj nejvýraznější spektrální změny - změny Ramanových pásů a fluorescenčního pozadí. Příslušné koeficienty V_2 nevykazují žádnou časovou závislost, protože jejich hodnoty fluktuují kolem nuly, váha třetího subspektra je velmi malá a proto jej lze zanedbat.

Při zpracování série spekter směsi liposomů s komplexem oligonukleotidu a porfyrinu bylo použito jen první subspektrum komplexu jako jeden z vektorů ortogonální báze.

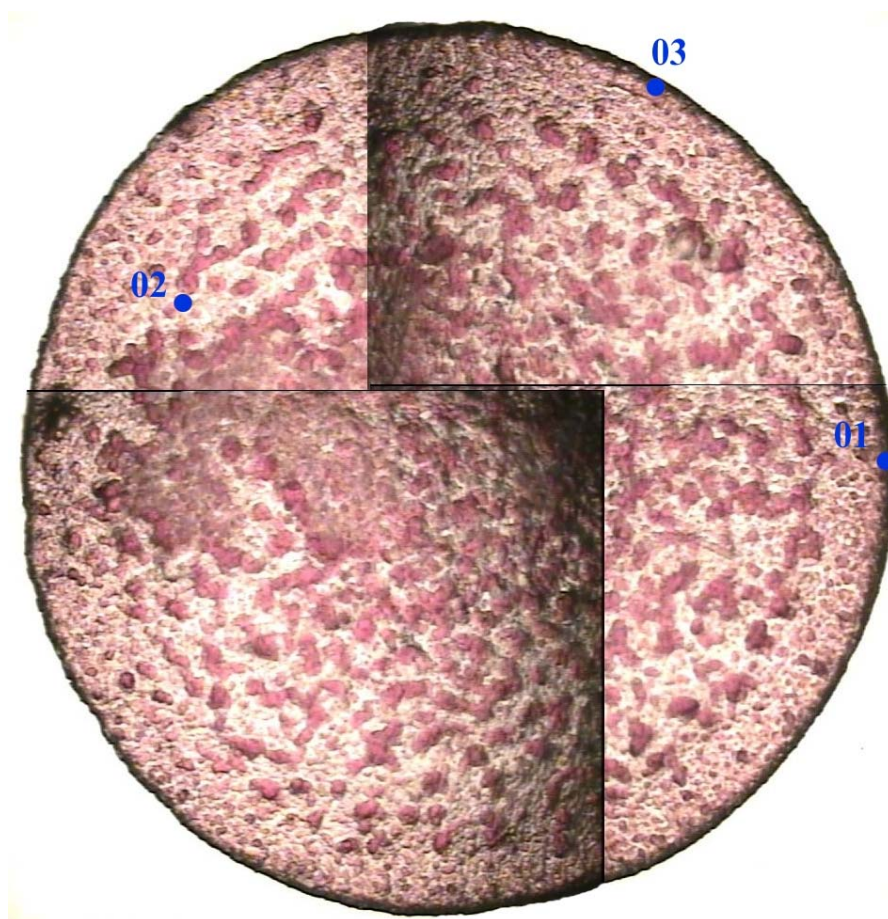


Obr. 34: Struktura porfyrinu H₂TMPyP₄ s označením uhlíků příslušejících různým typům vibrací.

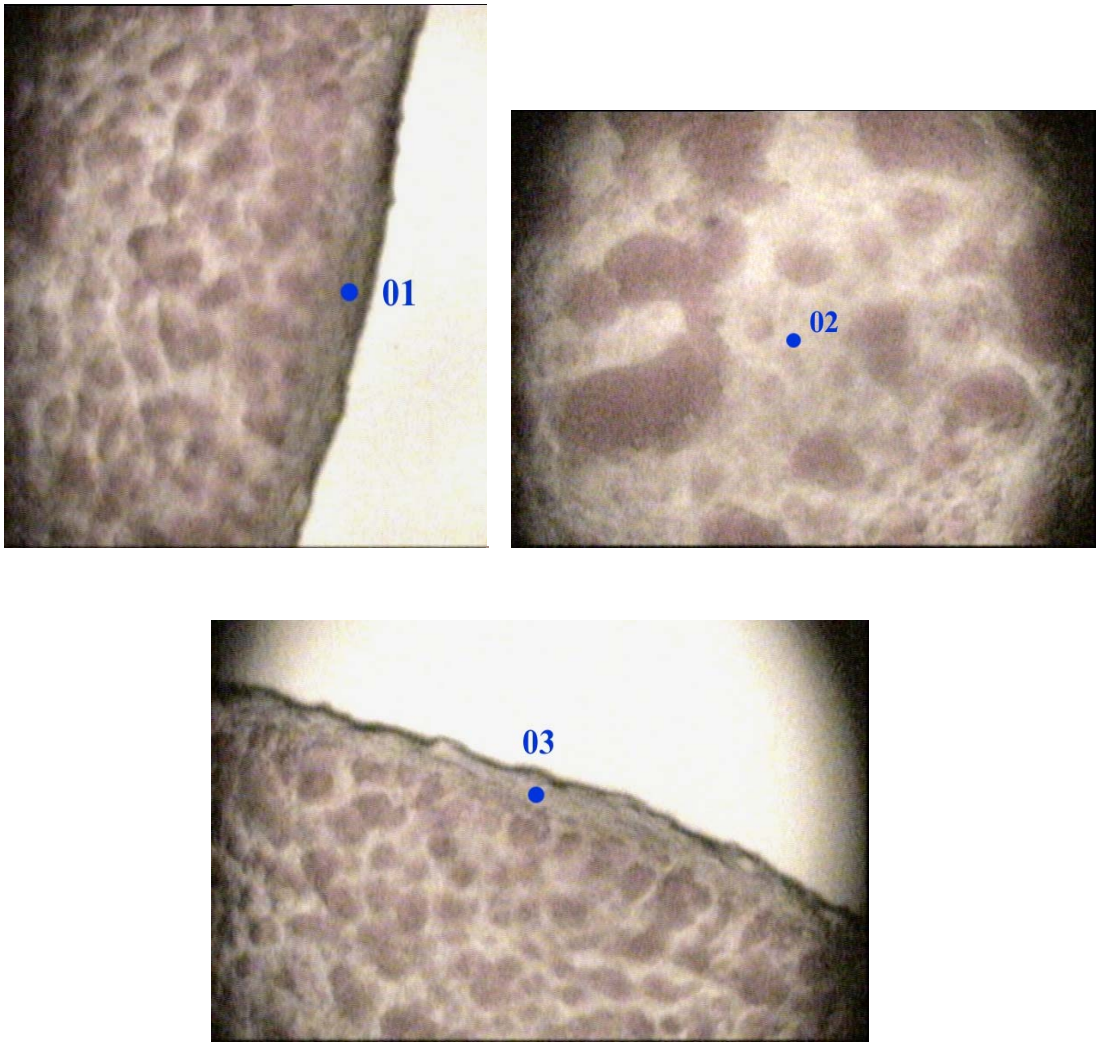
5.2.3. Interakce liposomů s komplexem oligonukleotidů a porfyriu

Komplex oligonukleotidu s porfyriu jsem smíchala se suspenzí liposomů (koncentrace lipidu 1,3 mM) v poměru 2:1, čímž vznikla směs, ve které 1 oligonukleotid dT₁₅ připadá na 4 molekuly lipidu.

Obrázky kapek směsi nanesených na destičku v časových intervalech 0, 1, 2, 4, 8 a 24 hodin po přípravě směsi byly získány objektivem 10×. Vzhled všech kapiček byl velmi podobný, pro ilustraci je na obr. 35 zobrazena kapka směsi nanesená 8 hodin po přípravě. Obrázek je složen ze 4 menších obrázků, které byly pořízeny kamerou zabudovanou do integrovaného Ramanova systému HR 800. Modré tečky značí místa, odkud byl sbírán Ramanův signál a čísla označují naměřená spektra. Objektivem 50× byl získán detail snímané oblasti. 50krát zvětšené nejbližší okolí měřených bodů 01, 02 a 03 je ukázáno na obr. 36.

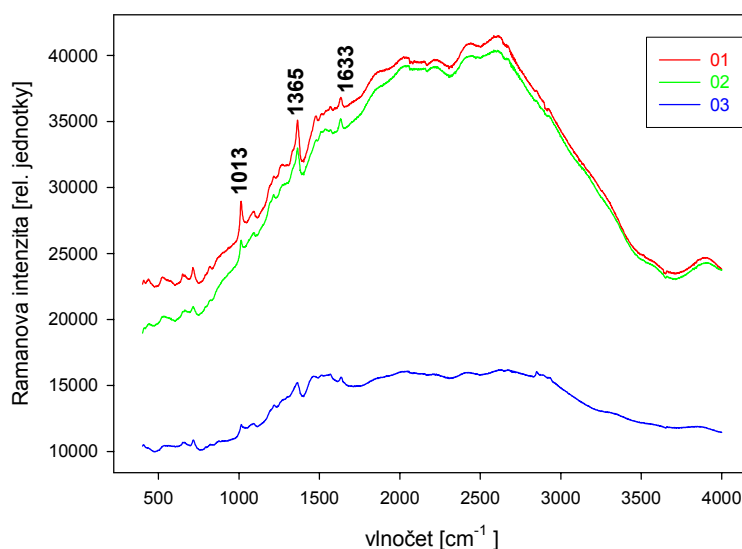


Obr. 35: 10krát zvětšený obrázek kapky směsi liposomů s komplexem oligonukleotidu a porfyriu nanesené na destičku 8 hodin po přípravě směsi.

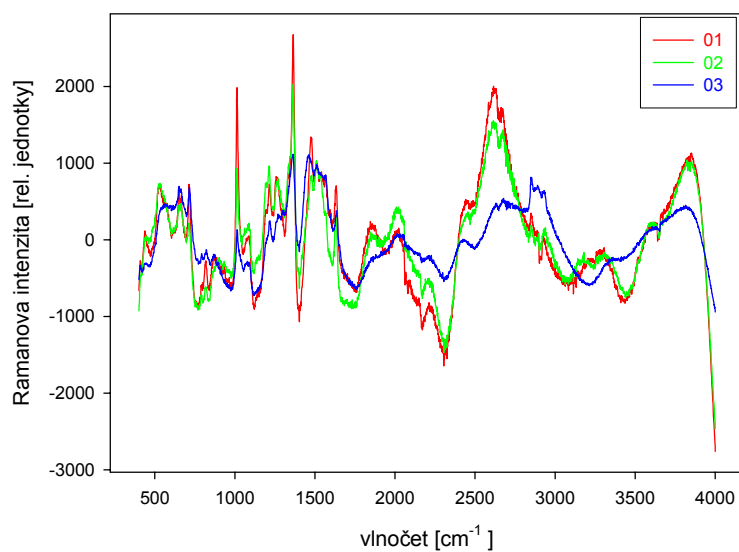


Obr. 36: 50krát zvětšené obrázky nejbližšího okolí bodů 01, 02 a 03, odkud byl sbírán signál.

Změřená spektra jedné kapky směsi liposomů s komplexem oligonukleotidu a porfyrinu jsou uvedena v grafu na obr. 37. Fluorescenční pozadí bylo odstraněno metodou ortogonálních diferencí (viz. kapitola 4.4.2.). Takto upravená spektra jsou v grafu na obr. 38, pro ortogonalizaci byl zvolen polynom 6. stupně.



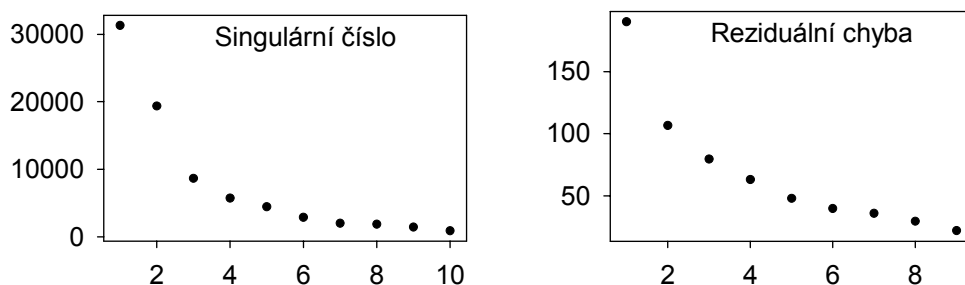
Obr. 37: Naměřená spektra kapky směsi nanesené 8 hodin po přípravě.



Obr. 38: Spektra kapky směsi nanesené 8 hodin po přípravě upravené metodou ortogonálních diferencí, fluorescenční pozadí bylo odstraněno za použití polynomu 6. stupně.

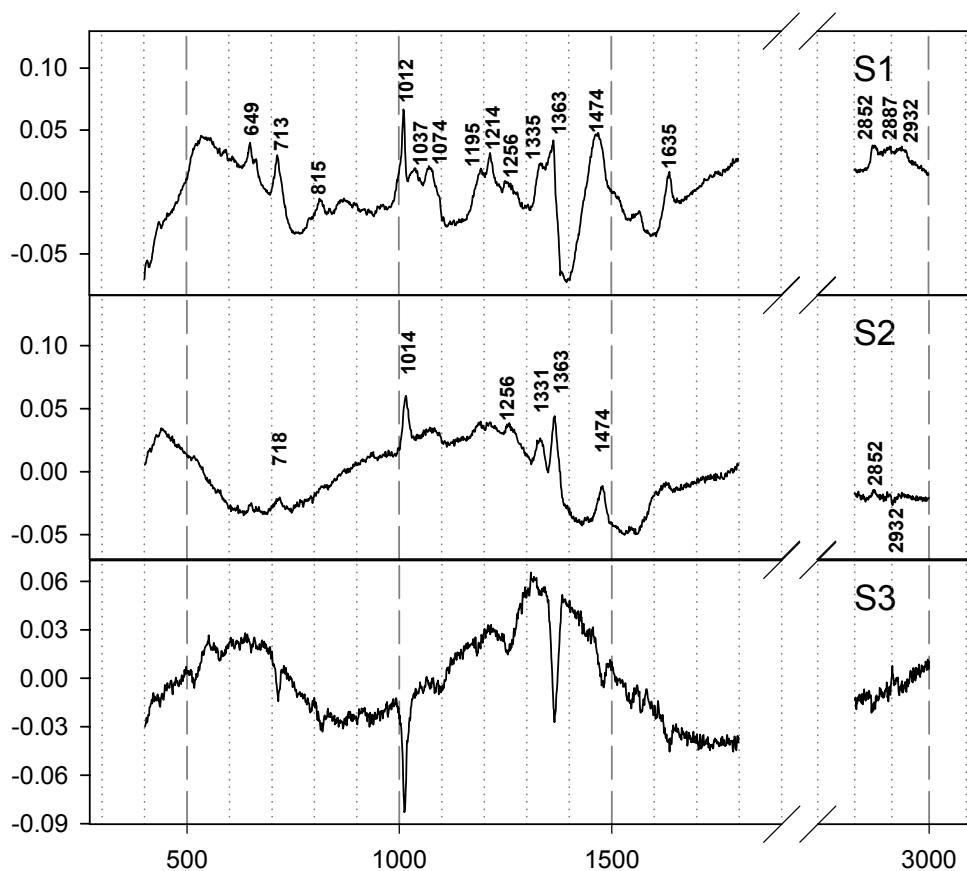
Z každé kapky bylo opět vybráno několik charakteristických spekter, tímto způsobem vznikla série 10 spekter, u kterých bylo fluorescenční pozadí odstraněno rovněž metodou ortogonálních diferencí. Spektra byla ortogonalizována vůči polynomu 6. stupně, spektru liposomů a prvnímu subspektru komplexu oligonukleotidu a porfyriu.

Na sérii takto upravených spekter směsi změřených v časovém intervalu 0, 1, 2, 4, 8 a 24 hodin po přípravě byla aplikována faktorová analýza, jejíž výsledky jsou v následujících grafech.

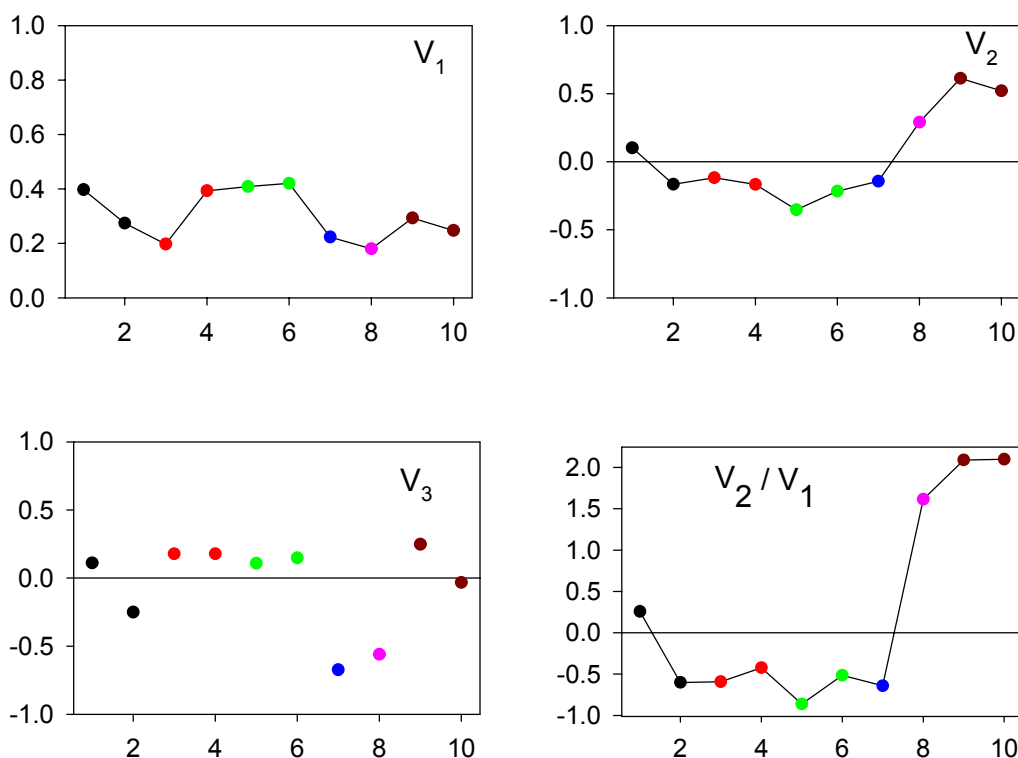


Obr. 39: Singulární číslo a reziduální chyba pro sérii spekter směsi.

Z hodnot singulárního čísla a reziduální chyby je patrné, že faktorová dimenze série spekter je opět rovna dvěma. Pro ilustraci jsou v grafech na obr. 40 uvedena první tři subspektra.



Obr. 40: První tři subspektra série spekter kapek směsi nanesených v časovém intervalu 0-24 hodin.



Obr. 41: Hodnoty koeficientů V_1 , V_2 , V_3 a V_2/V_1 .

Barevné označení koeficientů je stejné jako u komplexu oligonukleotidu s porfyrinem. První subspektrum vystihuje nejsilněji zastoupený spektrální profil v celé sérii spekter. Jeho zastoupení v jednotlivých spektrech udává velikost koeficientu V_1 . Hodnoty koeficientu V_1 fluktuují v intervalu 0,2 až 0,4, což odráží kolísání intenzity v jednotlivých spektrech. Při porovnání spektrálního profilu CuTMPyP₄ (obr. 25) a prvního subspektra směsi (obr. 40) je patrný výrazný pokles intenzity pásu 1568 cm⁻¹, odpovídající vibracím porfyrinového kruhu ν_2 (C_β - C_β valenční vibrace) [56]. V prvním subspektru směsi pozorujeme nový pás v poloze 1474 cm⁻¹, jeho přiřazení není zřejmé, ale podle [56] nejbližší vibrace (1465 cm⁻¹) odpovídá valenční vibraci (C_α - C_β) porfyrinového jádra. Další spektrální změny byly pozorovány v oblasti od 1100 cm⁻¹ do 1300 cm⁻¹. Pozorujeme změny poměrů intenzit pásů: 1195 cm⁻¹ odpovídající deformační vibraci N-methylpyridinové skupiny (označované δ (pyr)) a valenční vibraci (N^+ -CH₃), pásu 1214 cm⁻¹ odpovídající téže vibraci δ (pyr) a 1256 cm⁻¹ odpovídající deformační vibraci δ (C_m -pyr); přičemž nejvýraznější je pokles intenzity pásu 1256 cm⁻¹. V oblasti valenčních vodíkových

vibrací od 2800 cm^{-1} do 3000 cm^{-1} , kde je možno pozorovat vibrace příslušející lipidu, se také mění poměr intenzit pásů 2852 cm^{-1} , 2887 cm^{-1} a 2932 cm^{-1} , a to především prvního a třetího, jak je vidět ve druhém subspektru na obr. 40. Orientace pásu 2932 cm^{-1} je v prvním subspektru kladná, ve druhém subspektru se jeho orientace změnila. Změny v této části spektra souvisejí s uspořádáním uhlovodíkových řetězců mastných kyselin lipidu. Tyto výše zmíněné efekty poukazují na interakci liposomu s komplexem oligonukleotidu a porfyrinu.

Ve druhém subspektru je vidět diferenční charakter a výrazně odlišné pozadí oproti prvnímu subspektru. Rovněž koeficienty V_2 jsou zatíženy chybou způsobenou kolísáním intenzity, pro eliminaci tohoto vlivu byly koeficienty V_2 vyděleny hodnotou koeficientů V_1 . Z tohoto poměru koeficientů je patrné, že k největším spektrálním změnám dochází v časech 8 a 24 hodin po přípravě směsi (obr. 41). Tyto změny jsou dány nejen rozdílným spektrem Ramanova rozptylu, ale též odlišným spektrálním pozadím.

Váha třetího subspektra je stejně jako v případě komplexu oligonukleotidu a porfyrinu malá vůči předchozím dvěma subspektrům a jeho příspěvek jsme proto zanedbali.

6. Závěr

V diplomové práci byly optimalizovány parametry pro měření Ramanových spekter liposomů z roztoku na podložním sklíčku a pomocí metody kapkově nanášených povlaků (DCDR). Lepších výsledků při měření spekter liposomů na skle bylo dosaženo zařazením „spaceru“, protože takto získaná spektra neobsahují příspěvky od podložního skla (obr. 24a). Použitím DCDR techniky bylo dosaženo větší koncentrace liposomů, čímž došlo k výraznému zesílení Ramanova signálu a tím získání kvalitnějších spekter (obr. 28). V procesu vysychání kapek liposomů na destičkách Tienta Sciences - SpectRIM™ docházelo k oddělení liposomů od pufru takovým způsobem, že se liposomy koncentrovaly v okrajové části kapky, zatímco pufr vykrytalizoval v její centrální části (obr. 27).

Při interakci oligonukleotidu dT₁₅ s kationickým porfyrinem CuTMPyP₄ byl pozorován nárůst fluorescence při měření na podložním skle i na destičce s emisním maximem okolo 2500 cm⁻¹, což odpovídá 752 nm při použití excitační vlnové délky 633 nm (obr. 37). Toto emisní maximum je shodné s emisním maximem metalovaného porfyriu, v případě demetalace CuTMPyP₄ by docházelo k posuvu k 720 nm. Přirozená fluorescence CuTMPyP₄ je ve vodném prostředí zhasena molekulami vody vytvářející s porfyrinem komplex. Pozorovaný nárůst fluorescence je pravděpodobně způsoben poklesem tohoto zhasení. Při interakci porfyriu s oligonukleotidem tedy dochází k narušení vodní obálky porfyriu. Z toho lze usuzovat na vazbu porfyriu k oligonukleotidu takovým způsobem, že je částečně omezen přístup vodních molekul k porfyrinu, které tak nemohou zhaset jeho fluorescenci. Podle literatury je prostorová struktura jednovláknového oligonukleotidu dT₁₅ poměrně neuspořádaná a není přesně definována. V případě jednovláknového oligonukleotidu tak tedy nelze hovořit o interkalaci porfyriu CuTMPyP₄ ani o jeho vazbě do žlábků. Z těchto důvodů je interpretace výsledků Ramanovy spektroskopie série spekter kapek směsi liposomů s komplexem oligonukleotidu dT₁₅ a porfyriu CuTMPyP₄ složitá a způsob vazby porfyriu CuTMPyP₄ na oligonukleotid dT₁₅ není zcela zřejmý.

Předpokládáme, že při interakci oligonukleotidu dT₁₅ s kationickým porfyrinem CuTMPyP₄ dochází ke kompenzaci záporného náboje fosfátové skupiny oligonukleotidu kladně nabitou N-methylpyridinovou skupinou porfyriu. V důsledku této elektrostatické interakce může být ovlivněn vnitřní porfyrinový

kruh, což pravděpodobně souvisí s tím, že většina pozorovaných změn byla přiřazena právě vibracím centrální části porfyrinu. U takto velké molekuly, jako je porfyrin, je většina vibrací vzájemně sprzęžena a tak se změna v jedné části molekuly může projevit ve vibracích jejího zbytku.

Ze spektrálních změn pozorovaných ve směsi liposomů s komplexem oligonukleotidu a porfyrinu lze usuzovat na interakci lipidu s tímto komplexem, při které pravděpodobně dochází k deformaci pyrolového kruhu porfyrinu a přeuspořádání uhlovodíkových řetězců lipidu. K detailnější charakterizaci této interakce budou provedeny další experimenty.

7. Literatura

1. Voet D., Voetová J.G. (1995): Biochemie. Victoria Publishing, Praha.
2. Garrett R. H., Grisham C. M. (1995): Biochemistry. Saunders College, USA.
3. Kurreck J. (2003): Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* **270**(8), 1628-44.
4. Saenger W. (1984): Principles of Nucleic Acid Structure. Springer-Verlag, New York.
5. Alberts a kol. (2001): Základy buněčné biologie. Espero publishing, Ústí nad Labem.
6. Vodrážka Z. (1982): Fyzikální chemie pro biologické vědy. Academia, Praha.
7. Watson P., Jones A. T., Stephens D. J. (2005): Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Adv Drug Deliv Rev* **57**(1), 43-61.
8. Studijní texty z postgraduálního cyklu přednášek "Vybrané semestrální přednášky z organické chemie" (2005). Supramolekulární chemie - kapitola 6: Biomimetika, dostupné na adrese: www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2005/6_Hampl.pdf.
9. Simoes S., Moreira J. N., Fonseca C., Duzgunes N., de Lima M. C. (2004): On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv Drug Deliv Rev* **56**(7), 947-65.
10. Maurer N., Fenske D. B., Cullis P. R. (2001): Developments in liposomal drug delivery systems. *Expert Opinion on Biological Therapy* **1**(6), 923-947.
11. Garcia-Chaumont C., Seksek O., Grzybowska J., Borowski E., Bolard J. (2000): Delivery systems for antisense oligonucleotides. *Pharmacol Ther* **87**(2-3), 255-77.
12. Seksek O., Bolard J. (2004): Delivery agents for oligonucleotides. *Methods Mol Biol* **252**, 545-68.
13. Israelichvili J. N., Marčelja S., Horn R. G. (1980): Physical Principles of Membrane Organization. *Q. Rev. Biophys* **19**, 121-200.
14. Fendler J.H. (1982): Membrane Mimetic Chemistry ed. J.Wiley New York.

15. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
16. Praus P., Kocisova E., Seksek O., Sureau F., Stepanek J., Turpin P. Y. (2007): Advanced microfluorescence methods in monitoring intracellular uptake of "antisense" oligonucleotides. *Current Organic Chemistry* **11**(6), 515-527.
17. Galderisi U., Casino A., Giordano A. (1999): Antisense Oligonucleotide as Therapeutic Agents. *Journal of Cellular physiology* **181**, 251-257.
18. Zamecnik P. C., Stephenson M. (1978): Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 280-284.
19. Eckstein F. (2000): Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **10**(2), 117-21.
20. Agrawal S., Kandimalla E. R. (2000): Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition? *Molecular medicine today* **6**, 72-81.
21. Phillips M. I., Zhang Y. C. (2000): Basic principles of using antisense oligonucleotides in vivo. *Methods Enzymol* **313**, 46-56.
22. Lebleu B., Moulton H. M., Abes R., Ivanova G. D., Abes S., Stein D. A., Iversen P. L., Arzumanov A. A., Gait M. J. (2008): Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* **60**(4-5), 517-29.
23. Weyermann J., Lochmann D., Zimmer A. (2004): Comparison of antisense oligonucleotide drug delivery systems. *J Control Release* **100**(3), 411-23.
24. Resina S., Abes S., Turner J. J., Prevot P., Travo A., Clair P., Gait M. J., Thierry A. R., Lebleu B. (2007): Lipoplex and peptide-based strategies for the delivery of steric-block oligonucleotides. *International Journal of Pharmaceutics* **344**(1-2), 96-102.
25. Lappalainen K., Miettinen R., Kellokoski J., Jaaskelainen I., Syrjanen S. (1997): Intracellular distribution of oligonucleotides delivered by cationic liposomes: Light and electron microscopic study. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **45**(2), 265-274.

26. Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M. (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21), 7413-7.
27. Matsui H., Pan S. (2001): Distribution of DNA in cationic liposome complexes probed by Raman microscopy. *Langmuir* **17**(3), 571-573.
28. Farhood H., Serbina N., Huang L. (1995): The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* **1235**(2), 289-95.
29. Lemaitre M., Bayard B., Lebleu B. (1987): Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(3), 648-52.
30. Joliot A., Prochiantz A. (2004): Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* **6**(3), 189-96.
31. Frankel A. D., Pabo C. O. (1988): Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**(6), 1189-93.
32. Abes S., Moulton H., Turner J., Clair P., Richard J. P., Iversen P., Gait M. J., Lebleu B. (2007): Peptide-based delivery of nucleic acids: design, mechanism of uptake and applications to splice-correcting oligonucleotides. *Biochemical Society Transactions* **35**, 53-55.
33. Sazani P., Kole R. (2003): Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J Clin Invest* **112**(4), 481-6.
34. Flynn S. M., George S. T., White L., Devonish W., Takle G. B. (1999): Water-soluble, meso-substituted cationic porphyrins - a family of compounds for cellular delivery of oligonucleotides. *Biotechniques* **26**(4), 736.
35. Benimetskaya L., Takle G. B., Vilenchik M., Lebedeva I., Miller P., Stein C. A. (1998): Cationic porphyrins: novel delivery vehicles for antisense oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res* **26**(23), 5310-7.

36. Kocisova E., Praus P., Mojzes P., Sureau F., Stepanek J., Seksek O., Turpin P. Y. (2006): Cellular uptake of phosphorothioate oligonucleotide facilitated by cationic porphyrin: a microfluorescence study. *Biopolymers* **82**(4), 325-8.
37. Mojzes P., Kruglik S. G., Baumruk V., Turpin P. Y. (2003): Interactions of Electronically Excited Copper(II)-Porphyrin with DNA: Resonance Raman Evidence for the Exciplex Formation with Adenine and Cytosine Residues. *J. Phys. Chem. B* **107**(31), 7532-7535.
38. Lugo-Ponce P., McMillin D. R. (2000): DNA-binding studies of Cu(T4), a bulky cationic porphyrin. *Coordination Chemistry Reviews* **208**, 169-191.
39. Prosser V. , kol. (1989): Experimentální metody biofyziky. Academia, Praha.
40. Zhang D., Xie Y., Mrozek M. F., Ortiz C., Davisson V. J., Ben-Amotz D. (2003): Raman Detection of Proteomic Analytes. *Anal. Chem.* **75**(21), 5703-5709.
41. Deegan Robert D., Bakajin Olgica, Dupont Todd F., Huber Greb, Nagel Sidney R., Witten Thomas A. (1997): Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature* **389**(6653), 827-829.
42. Filik J., Stone N. (2007): Drop coating deposition Raman spectroscopy of protein mixtures. *Analyst* **132**, 544-550.
43. Kopecký V. Jr., Bartoš A., Hofbauerová K., Křištofiková Z. Drop coating deposition Raman spectroscopy of body fluids with special respect to cerebrospinal fluid - a pilot study. In 20th International Conference on Raman Spectroscopy: ICORS 2006. Venue The University of Tokyo, Tokyo.
44. http://www.laserfocusworld.com/articles/article_display.html?id=209796 (10.04.2008).
45. Němeček D., Kočišová E., Praus P. (2006): Studium oligonukleotidů pokročilými technikami optické spektroskopie. *Fyzikální metody v Biologii* **56**, 319-326.
46. Praus P., Kočišová E., Seksek O., Sureau F., Štěpánek J., Turpin P. Y. (2007): Advanced Microfluorescent Methods in Monitoring Intracellular Uptake of "Antisense" Oligonucleotides. *Current Organic Chemistry* **11**, 515-527.
47. Šípová H. (2006): Bakalářská práce - Studium biomolekul pomocí SERS spektroskopie na pevných kovových nanosubstrátech.

48. Bangham A. D. (1968): Membrane models with phospholipids. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **18**, 29-36.
49. Malinowski E. R. (2002): Factor Analysis in Chemistry. Wiley, New York.
50. Něměček D. (2004): Dizertační práce - A New Generation of Synthetic Oligonucleotide Analogs Usable in Antisense Strategy: Hybridization Properties and Stability of Complexes Formed with Their Natural DNA Counterparts. MFF UK a UPMC Paris 6; Praha, Paříž.
51. Yiming X., Hongxia Z., Zhiyi Z. (1998): Raman spectroscopic study of microcosmic and photosensitive damage on the liposomes of the mixed phospholipids sensitized by hypocrellin and its derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **43**, 41-46.
52. Sailer K., Viaggi S., Nüsse M. (1997): Kinetics of radiation- and cytochrome c-induced modifications in liposomes analysed by FT-Raman spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1329**, 259-268.
53. Kano K., Takei M., Hashimoto S. (1990): Cationic Porphyrins in Water - H-1-Nmr and Fluorescence Studies on Dimer and Molecular-Complex Formation. *Journal of Physical Chemistry* **94**(5), 2181-2187.
54. McMillin D. R., McNett K. M. (1998): Photoprocesses of Copper Complexes That Bind to DNA. *Chem Rev* **98**(3), 1201-1220.
55. Kruglik S. G., Mojzes P., Mizutani Y., Kitagawa T., Turpin P. Y. (2001): Time-resolved resonance raman study of the exciplex formed between excited Cu-porphyrin and DNA. *Journal of Physical Chemistry B* **105**(21), 5018-5031.
56. Blom N., Odo J., Nakamoto K., Strommen D. P. (1986): Resonance Raman Studies of Metal "Tetrakis(4-N-Methylpyridyl)Porphine - Band Assignments, Structure-Sensitive Bands, and Species Equilibria. *Journal of Physical Chemistry* **90**(13), 2847-2852.