

FLUORESCENČNÍ VLASTNOSTI KVARTÉRNÍCH BENZO[c]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ A JEJICH VYUŽITÍ JAKO SUPRAVITÁLNÍCH DNA SOND

IVA SLANINOVÁ^a, JIŘÍ SLANINA^b
a EVA TÁBORSKÁ^b

^a Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Kamenice 5, pavilon A6, 625 00 Brno, ^b Biochemický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Kamenice 5, pavilon A16, 625 00 Brno
ipokorna@med.muni.cz, jrslanina@med.muni.cz;
taborska@med.muni.cz

Došlo 3.7.07, přijato 5.9.07.

Klíčová slova: benzo[c]fenanthridinové alkaloidy; supravitální DNA sondy, buněčný cyklus, fluorescence, průtoková cytometrie, makarpin

Obsah

1. Úvod
2. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů
3. Interakce kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů s buněčnými strukturami
 - 3.1. Interakce kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů s DNA
4. Průtoková cytometrie
5. Fluorescenční DNA sondy
6. Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy jako supravitální DNA sondy
 - 6.1. Využití makarpinu v průtokové cytometrii
7. Závěr

1. Úvod

Alkaloidy jsou nízkomolekulární sekundární rostlinné metabolity, obsahující ve své molekule dusík. Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy (KBA) patří do skupiny isochinolinových alkaloidů a vyskytují se v rostlinách čeledi *Fumariaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae* a *Rutaceae*.

Sanguinarin (SA) a chelerythrin (CHE) jsou jediné dva komerčně dostupné KBA, poprvé byly izolovány již v 19. století. Mezi minoritní KBA patří sanguirubin (SR), chelirubin (CHR), sanguilutin (SL), chelilutin (CHL) a makarpin (MA), poprvé izolované v 50. letech minulého století Slavíkem a Slavíkovou (viz přehledné referáty^{1–3}). Zastoupení alkaloidů v jednotlivých rostlinných druzích popsala Suchomelová a spol.⁴

Kromě významných biologických aktivit, jako je anti-proliferativní, antiapoptotický, antimikrobiální efekt

a ovlivnění celé škály enzymů, které byly mimo jiné nedávno shrnuty v tomto časopise^{5,6} a dalších pracích⁷, vykazují KBA i zajímavé barevné a fluorescenční vlastnosti^{8–14}. Všechny KBA jsou výrazně barevné v rozsahu spektra od žluté po červenou barvu. Chromofory zodpovědnými za barevnost jsou kondenzovaná aromatická jádra s elektron-donorovými substituenty obsahujícími kyslík (-OH, -OCH₃ a -OCH₂O-). Barevnost a schopnost fluorescence v kombinaci s různorodým biologickým účinkem nabádá ke studiu interakce alkaloidů s buněčnými strukturami pomocí fluorescenční mikroskopie. Na základě takovýchto studií jsme zjistili, že MA, SA a CHR jsou bezprostředně po přidání k živým buňkám lokalizovány v jádře¹⁴. Kombinace vlastností fluorescence a schopnosti vázat se na buněčné struktury otevírá otázku využitelnosti těchto alkaloidů jako specifických fluorescenčních sond vhodných pro fluorescenční mikroskopii a průtokovou cytometrii.

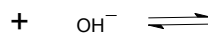
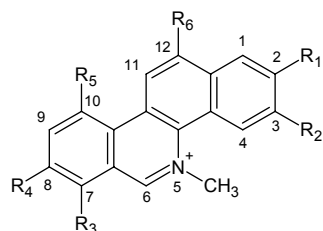
2. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů

Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy se v závislosti na pH prostředí vyskytují ve dvou základních molekulárních formách, kvartérní neboli iminiové (kationtové) a pseudobáze neboli alkanolaminu (obr. 1, cit.^{1,2,5}). Kvartérní forma je polární a výrazně barevná, zatímco hydroxyadukt ztrácí barvu, je nepolární a nerozpustný ve vodě. Rovnováha mezi kvartérní formou a terciární pseudobází je závislá na pH a je ji možné popsat pomocí konstant pK, které jsou analogické konstantám pK_A pro Brønstedovy kyseliny. Hodnoty pK odpovídají pH prostředí, ve kterém se obě formy vyskytují ve stejných molárních koncentracích. Pro KBA se hodnoty pK pohybují v rozmezí 7,70 (chelirubin) až 9,00 (chelerythrin)¹. Obě formy se tedy mohou vyskytovat *in vivo*, kvartérní forma však bude za fyziologických hodnot pH převládající.

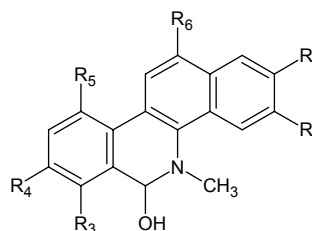
Obě formy se liší i svými fluorescenčními vlastnostmi. U KBA, které mají větší počet kondenzovaných aromatických kruhů, byla excitace i emise pozorována ve vyšších vlnových délkách, než je tomu např. u dihydroderivátů těchto alkaloidů⁸. Zatímco dihydrosanguinarin (obr. 2) má absorpční a excitační maximum při vlnových délkách 320–330 nm a emisní maximum 430 nm, kvartérní formy sanguinarinu a chelerythrinu absorbují při 440 až 470 nm a emitují při 550–565 nm. Po přeměně kvartérní formy na pseudobázi je jejich struktura a optické vlastnosti (λ_{exc} 323–326 nm; λ_{em} 420 nm) podobné jako u dihydroderivátů. Podobná data naměřil i Maiti a spol. (i.e. λ_{em} 577 nm pro kvartérní formu a λ_{em} 418 nm a 327 pro pseudobázi¹⁵; tabulka I).

Fluorescence KBA tedy závisí na tom, v jaké struk-

a

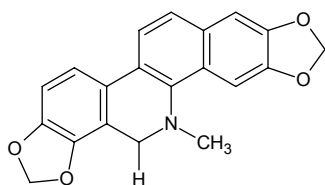


b



	Alkaloid	R1	R2	R3	R4	R5	R6
SA	sanguinarin	-OCH ₂ O-		-OCH ₂ O-		H	H
CHE	chelerythrin	-OCH ₂ O-		-OCH ₃	-OCH ₃	H	H
SR	sanguirubin	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₂ O-		-OCH ₃	H
CHE	chelirubin	-OCH ₂ O-		-OCH ₂ O-		-OCH ₃	H
SL	sanguilutin	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	H
CHL	chelilutin	-OCH ₂ O-		-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	H
MA	makarpin	-OCH ₂ O-		-OCH ₂ O-		-OCH ₃	-OCH ₃

Obr. 1. Chemická struktura kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů; a) kvartérní neboli iminiová (kationtová) forma, b) pseudobáze neboli hydroxyadukt



Obr. 2. Chemická struktura dihydrosanguinarinu

turní formě se v daném prostředí nacházejí. Tato forma může být ovlivněna hodnotou pH prostředí i typem rozpouštědla. Fluorescenci např. snižuje přítomnost jodidových iontů¹⁶. Přítomnost methylenedioxy skupiny, namísto dvou methoxylových skupin v molekule, zvyšuje vlnovou délku excitace a emise. Fluorescenční vlastnosti KBA jsou shrnuty v tabulce I.

Tabulka I

Acidobazické a fluorescenční vlastnosti vybraných benzo[c]fenanthridinových alkaloidů (cit.⁸)

Alkaloid		pK _A	λ (exc.) [nm]	λ (em.) [nm]
Dihydrosanguinarin	kyselé prostředí	2,3–2,6	324	390
	alkalické prostředí		324	430
Sanguinarin	kyselé prostředí	7,95–8,05	468	565
	alkalické prostředí		326	420
Chelerythrin	kyselé prostředí	8,9–9,0	440	550
	alkalické prostředí		323	420

3. Interakce kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů s buněčnými strukturami

Fluorescence alkaloidů je výhodná vlastnost pro studium jejich vstupu do buněk a jejich lokalizace v buňkách. Práci s tematikou fluorescence kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů v buněčných strukturách není mnoho a většina se zabývá jejich lokalizací v rostlinných buňkách. Roschina popsala oranžovou fluorescenci SA a CHE v sekrečních buňkách rostlin rodů *Achillea*, *Artemisia* a *Gaillardia*. Pozorovala fluorescenci alkaloidů jednak v sekrečních měchýřcích a jednak na buněčném povrchu¹¹. Dalšími autory byla po přidání alkaloidů k rostlinným buňkám pozorována modrá a oranžová fluorescence dihydroderivátů, zatímco červená fluorescence kvartérní formy byla pozorovatelná pouze na buněčném povrchu. Na základě těchto pozorování autoři usoudili, že k průchodu KBA přes membránu je pravděpodobně potřebná jejich redukce z kvartérní na dihydroformu¹⁷. Holy

a spol.¹² studovali průnik SA do lidských nádorových buněk MCF-7 a jeho distribuci v těchto buňkách ve srovnání fluorochromem Hoechst 33342, který se pro značení jader v živých buňkách běžně používá. Zjistili, že fluorescence Hoechst 33342 stoupá v průběhu 2 hodin po přidání a je lokalizována výhradně v jádrech. SA pronikal do buněk mnohem rychleji a během několika minut byl pozorovatelný v podobě malých cytoplasmatických agregátů. Intenzita fluorescence těchto agregátů klesala a zároveň se objevovala fluorescence jádra, která nakonec převažovala. Jaderná fluorescence SA byla méně stabilní než Hoechst 33342 a během několika hodin slábla. Po 6 hodinách byla výrazně slabší a po 24 hodinách zmizela úplně. Podobné chování SA jsme zaznamenali již dříve při značení lidských nádorových buněk HeLa¹³. V naší nedávné práci jsme popsali fluorescenci SA, CHE, SR, CHR, SL, CHL a MA v buňkách lidských tkáňových kultur¹⁴. Zjistili jsme, že všechny tyto alkaloidy pronikají velmi rychle do živých buněk a navíc SA, MA a CHR se bezprostředně po přidání inkorporovaly do jádra a dávaly obraz podobný tomu, který poskytují komerční DNA sondy, jako např. propidium jodid a DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindol). Fluorescence jader byla jasně červená. Ostatní testované alkaloidy (SL, CHL, CHE) se vyskytovaly v agregátech nebo měchýřcích v blízkosti jádra. Schopnost SR pronikat do jádra byla pokus od pokusu variabilní. V některých pokusech vstupoval do jádra a dával obraz podobný CHR a MA, v jiných se vyskytoval pouze v cytoplasmatických měchýřcích podobně jako SL a CHL.

Jak již bylo zmíněno, výskyt dané molekulární formy (kvartérní nebo pseudobáze) je závislý na pH prostředí^{1–3}. Rovnováha mezi těmito dvěma formami je reverzibilní. V kyselejších prostředí převládá kvartérní forma a její barva je vlastně indikátorem pH (cit.¹). Vzhledem k tomu, že jsme pozorovali fluorescenci různých barev v různých buněčných lokalizacích, předpokládáme, že je tato různorodost způsobena přítomností různých molekulárních forem.

3.1. Interakce kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů s DNA

Skutečnost, že kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy interagují s DNA *in vitro* byla potvrzena i jinými metodami. Sen a Maiti¹⁸ podali na základě použití spektrofotometrických, spektrofluorimetrických a viskozimetrických studií jasný důkaz o interkalaci kvartérní formy SA do DNA. Pozorovali typický bathochromní (posun k delším vlnovým délkám, nižší frekvenci) a hypochromní (pokles intenzity fluorescence) spektrální posun (posun o 8 až 10 nm v červené oblasti spektra), vyhasínání fluorescence a vzrůst fluorescenční polarizační anizotropie¹⁸. Tyto vlastnosti jsou typické právě pro interkalační látky. Při interakci DNA s pseudobázemi tyto efekty pozorovány nebyly. Schopnost interkalace kvartérní formy SA i CHE, srovnatelná s typickým interkalátorem ethidium bromidem, byla prokázána i metodou kapilární zónové elektro-

forézy¹⁹. K interkalaci KBA dochází především v místech bohatých na báze G-C (cit.¹⁸). To potvrdili fluorimetrickými a spektrometrickými studii i Bai a spol.²⁰ při studiu interakce SA a CHE s DNA telecího brzlíku a s polydeoxynukleotidy. SA se vázal přednostně na oblasti bohaté na GC báze [d(TGCGCA)₂]. CHE vykazoval rozdílnou GC selektivitu, specificky se vázal především na oblasti [5'-TGGGGA-3'/3'-ACCCCT-5']. Schopnost vázat se na DNA byla u CHE nižší než u SA. To je v souladu s námi pozorovaným mikroskopickým obrazem buněk po aplikaci těchto alkaloidů^{13,14}. Termodynamické studie prokázaly, že vazba kvartérní formy na DNA je podobně jako u jiných interkalátorů entropicky řízená¹⁸. Interkalace SA do DNA byla prokázána i metodami NMR (cit.²¹).

Kromě interkalace byly prokázány i další mechanismy interakce s DNA. Bylo zjištěno, že SA inhibuje replikaci DNA pomocí polymerasy I, a to právě tvorbou komplexů s DNA (cit.²²). Tvorba aduktů SA-DNA byla prokázána i metodou ³²P-postlabelingu²³.

Předpoklad, že základním mechanismem interakce KBA s DNA je právě interkalace, podporuje i skutečnost, že KBA jsou strukturálně příbuzné fenanthridinům, jejichž zástupci ethidium bromid a propidium jodid jsou nejčastěji používanými fluorochromy značícími jádra, a to mechanismem interkalace. Schopnost interkalace a tím značení jader jednotlivými alkaloidy souvisí pravděpodobně s detailní strukturou jejich molekuly. Na základě našich pozorování fluorescence jednotlivých alkaloidů v buňkách a porovnání jejich molekulární struktury předpokládáme, že schopnost alkaloidu interkalovat do DNA ovlivňují především substituenty na pozicích C7 a C8. Tyto předpoklady potvrzují i výsledky práce zabývající se studiem trojrozměrné struktury sedmi základních KBA (SA, CHE, SL, CHL, SR, CHR, a MA) metodami kvantové chemie²⁴. Výsledky výše zmíněné práce ukazují, že geometrie aromatických kruhů všech studovaných alkaloidů je přibližně stejná a že jejich molekuly nejsou zcela planární. Odchylky od planarity molekuly způsobuje pravděpodobně interakce methylové skupiny připojené k dusíku s vodíkem vázaným na C4 (obr. 1, cit.²⁴). Dalším významným strukturálním parametrem molekuly alkaloidů je orientace substituentů v pozicích 2,3 a 7,8. Leží většinou ve stejné rovině jako aromatický kruh s výjimkou methoxy skupiny na uhlíku C7. Ta je orientována téměř kolmo k této rovině. Kolmá orientace je pravděpodobně způsobena interakcí methoxy skupiny s vodíkem H6 a substituentem na uhlíku C8 (cit.²⁴). Z toho lze usuzovat, že alkaloidy obsahující methoxy skupinu na C7 (CHL, SL a CHE) mají sníženou schopnost interkalace do DNA. Tento předpoklad potvrdily i naše výsledky mikroskopického studia, které ukázaly, že CHL a SL nepronikají do jader vůbec a CHE jen výjimečně a jeho fluorescence v jádrech je slabá a nestálá. Naopak velmi dobře zobrazovaly jádra MA, CHR a SA. SR v některých pokusech značil jádra zcela srovnatelně s CHR, v jiných převažovala fluorescence cytoplasmatických struktur¹⁴. Chování SR nastoluje otázku, zda schopnost interkalace není, i když v menší míře, negativně ovlivněna také methoxy skupinami na uhlících C2 nebo C3.

Jak bylo zmíněno výše, u alkaloidů MA, SA, CHR a částečně SR jsme zaznamenali výraznou schopnost značit jádra. Struktura jader značených těmito alkaloidy se dá pozorovat na úrovni fluorescenční mikroskopie (obr. 3), kde je obraz podobný jako po značení pomocí běžně používaných DNA sond jako propidium jodid nebo DAPI. U mitotických buněk jsou rozlišitelné chromosomy, u apoptotických apoptotické jaderné fragmenty. Buňky značené alkaloidy je možné detegovat i na průtokovém cytometru nebo fluorimetru. Nejlepší vlastnosti vzhledem k použitelnosti jako DNA sondy vykazoval MA. Působil navíc v nejnižší koncentraci ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). Schopnost velmi rychle pronikat do živých nepermeabilizovaných buněk společně se schopností emitovat světelné záření v oblasti červeného spektra může zařadit tyto alkaloidy, a především MA, mezi široce využitelné fluorescenční DNA sondy jako jsou LDS 751, DRAQ5 (cit.²⁵) a nově i Vybrant^(R) DyeCycleTM Stains od Molecular Probes (cit.²⁶). Tyto sondy mají využití ve fluorescenční mikroskopii, včetně laserové konfokální mikroskopie a především v průtokové cytometrii.

4. Průtoková cytometrie

Cytometrie zahrnuje metody měření fyzikálních a chemických vlastností jednotlivých buněk. Průtoková cytometrie umožňuje měření částic a buněk, které protékají přístrojem v proudu nosné kapaliny. Využívá princip rozptylu světla, excitace a emise fluorochromních molekul k získání dat z mikroskopických částic a buněk. Umožňuje měřit několik parametrů současně. Buňky jsou většinou značeny specifickými fluorochromy. Při této metodě jsou buňky hydrodynamicky soustředěny do tenkého proudu

v kapiláře, kterou protékají vysokou rychlostí, přičemž jsou ozařovány monochromatickým koherentním zářením produkovaným laserem. Jedinečnost průtokové cytometrie spočívá v tom, že na rozdíl od spektrofotometrie, která měří sumární absorpci nebo transmisii, lze s její pomocí měřit fluorescenci každé částice nebo buňky zvlášť. Intenzita fluorescence jednotlivých buněk pak odpovídá množství struktur, které na sebe vážou fluorescenční barvivo (přehledně²⁵). Některé průtokové cytometry umožňují i třídít buňky na základě stanovených charakteristik – sorty buněk (FACS- fluorescence associated cell sorter).

Hlavními výhodami průtokové cytometrie jsou: (i) jednoduchá příprava vzorků, (ii) vysoká rychlost analýz velkých souborů jednotlivých buněk nebo částic, (iii) nedeaktivnost, (iv) snadná detekce subpopulací a také (v) relativně nízké finanční náklady na analýzu jednoho vzorku.

Průtoková cytometrie je v klinické praxi využívána jako významná diagnostická metoda především v hematologii, onkologii a imunologii. Široké využití má také v základním biologickém výzkumu.

5. Fluorescenční DNA sondy

Značení nukleových kyselin, především DNA, fluorescenčními sondami patří mezi významné metody využívané ve výzkumu i v diagnostice. Tyto sondy umožňují jednak pozorování struktury jádra a jádérka ve fluorescenčním a konfokálním mikroskopu, jednak rozlišení jaderných buněk od buněk bezjaderných metodou průtokové cytometrie. Jen některé sondy jsou schopny se vázat na DNA kvantitativně (stechiometricky). To umožňuje rozlišit množství DNA v jednotlivých buňkách a určit fázi bu-

Tabulka II

Tabulka znázorňující nečastěji používané fluorochromy pro značení jader. (Podle katalogu Molecular Probes²⁶).

	Excitace [nm]	Emise [nm]; barva	Permeabilita
DAPI	358	461 modrá	semi-permeabilní
Hoechst 33342	350	461 modrá	permeabilní
Hoechst 34580	392	498 modrá	permeabilní
Hoechst 33258	352	461 modrá	permeabilní
7-aminoactinomycin (7-AAD)	546	647 červená	nepermeabilní
ethidium bromid	518	605 červená	nepermeabilní
propidium jodid	530	625 červená	nepermeabilní
LDS-751	543	712 DNA	permeabilní
	590	607 RNA červená/infračervená	
TO-Pro3	642	661 červená	nepermeabilní
DRAQ5 ^a	650	700 červená	permeabilní
SYTO	36 různých barev	modrá, zelená, oranžová, červená	permeabilní

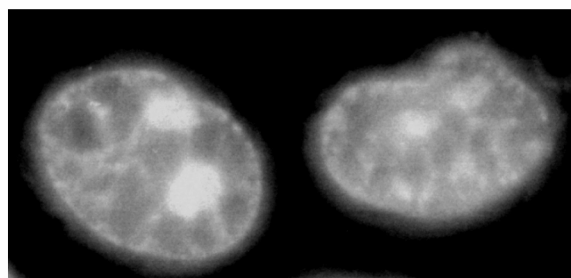
^a Fluorochrom DRAQ5 nabízí firma Alexis

něčného cyklu, ve které se daná buňka nachází. Tyto sondy jsou velmi významné z hlediska studia proliferační aktivity v dané populaci buněk v průtokovém cytometru. Jsou schopny určit poměrné zastoupení proliferujících buněk např. ve vzorcích leukemické krve, kostní dřeně nebo jiné nádorové tkáni. Pro tyto účely jsou zvláště významné fluorochromy, které pronikají do živých nepermeabilizovaných buněk, označované jako supravitální sondy. V dnešní době je k dispozici mnoho fluorochromů značících nukleové kyseliny (přehledně^{25,26}; tabulka II), ale jen některé jsou DNA specifické a většina z nich rozlišuje oblasti DNA podle poměru dvojic bází A-T/G-C (cit.²⁵). Většina těchto sond však neproniká do živých buněk a vyžaduje fixaci, permeabilizaci plasmatické membrány a enzymové odstranění RNA. Nejčastěji používané supravitální DNA sondy jsou DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindol) a bisbenzimidové deriváty Hoechst (33258 a 33342). DAPI i Hoechst vázané na DNA vyžadují excitaci v UV oblasti spektra a emitují modrou fluorescenci. Tento fakt je však znevýhodňuje pro použití pro analýzy v průtokovém cytometru. Běžně používané průtokové cytometry jsou vybaveny argonovým laserem produkujícím modré excitační záření (488 nm). Cytometry vybavené laserem excitujícím UV záření jsou drahé a proto méně používané. Z těchto důvodů jsou pro průtokové cytometrické analýzy DNA používány červené fluorochromy excitovatelné běžným argonovým laserem (488 nm), jako jsou fenanthridinový interkalátor propidium jodid a analog protinádorového antibiotika aktinomycinu D – 7-AAD (7-aminoaktinomycin D). Oba tyto fluorochromy se vážou na DNA kvantitativně a jsou použitelné rovněž pro analýzu buněčného cyklu, ale vyžadují fixaci a vzhledem k vazbě na RNA enzymové odstranění RNA. Nejčastěji používaným červeným fluorochromem, excitovatelným argonovým laserem, pronikajícím do živých buněk je LDS-751. Ten však neumožňuje rozlišit fáze buněčného cyklu. Dalšími jsou DRAQ5 (cit.^{27,28}) a zcela nové fluorochromy ze skupiny Vybrant, které značí DNA kvantitativně a buněčný cyklus zobrazují. Nejčastěji používané fluorochromy zobrazující DNA jsou uvedeny v tabulce II.

6. Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy jako supravitální DNA sondy

Při studiu interakce KBA s buňkami jsme zjistili, že SA, CHR a MA pronikají velmi rychle do jádra a umožňují zobrazit jeho strukturu na úrovni fluorescenčního mikroskopu (obr. 3). MA se navíc váže na DNA kvantitativně (stechiometricky). Má vlastnosti velmi podobné fluorochromu DRAQ5, včetně schopnosti detekce fází buněčného cyklu (obr. 4).

MA byl poprvé izolován z kořene rostliny *Macleaya microcarpa* v roce 1955 (cit.²⁹). Později byl nalezen i v dalších druzích čeledi *Papaveraceae*^{30–32}. Byla popsána i syntéza MA (cit.³³).



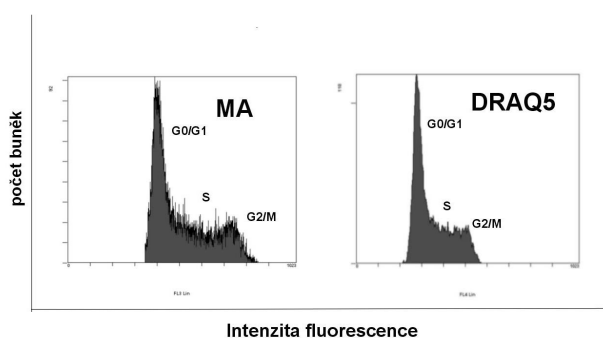
Obr. 3. Jádra HeLa buněk značená MA v koncentraci $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, pozorované fluorescenčním mikroskopem Leica DM 5000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Austria) za použití zeleného excitačního filtru; jádra jasně červeně fluoreskují a je patrná jejich struktura včetně jaderek

6.1. Využití makarpinu v průtokové cytometrii

MA má pro použití v průtokové cytometrii několik významných vlastností: (i) velmi rychle proniká do živých buněk a bezprostředně se váže na nukleové kyseliny, což umožňuje okamžité měření, (ii) je účinný v poměrně nízké koncentraci ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), (iii) fluorescence MA vázaného na DNA může být excitována běžnými argonovými lasery o vlnové délce 488 nm, (iv) emisní spektrální charakteristika MA vázaného k nukleovým kyselinám umožňuje současnou detekci jeho fluorescence vedle fluorescence některých běžných fluorochromů detegovatelných v kanálech FL1 a FL6 a vyšších, (v) kvantitativní vazbou na DNA umožňuje rozlišit fáze buněčného cyklu.

Díky těmto vlastnostem umožňuje MA detekci nukleových kyselin, především DNA, v živých buňkách i na standardních průtokových cytometrech vybavených excitačním zdrojem v modrozelené oblasti spektra (argonový laser, 488 nm) a třemi detektory fluorescence (FL1-FL3). Schopnost MA vázat se na DNA umožňuje velmi rychle a jednoduše rozlišit jaderné buňky od bezjaderných. Prokázali jsme, že tuto vlastnost lze využít pro rozlišení erytrocytů, retikulocytů a leukocytů a to bez detekce exprese povrchových znaků ve vzorku nesrážlivé krve¹⁴. V kombinaci se zviditelněním běžných leukocytárních a erytrocytárních antigenů umožňuje fluorescence MA klasifikaci a kvantifikaci leukocytů, nezralých erytrocytů a zralých erytrocytů na modelech anemie i u anemických pacientů. Toto značení umožňuje např. rozlišit CD45 pozitivní leukocyty s jasnou fluorescencí makarpinu od podskupin CD45 negativních krevních a krvetvorných buněk. Ve skupině CD45 negativních buněk fluorescence makarpinu rozlišuje makarpin pozitivní buňky obsahující pravděpodobně pouze RNA (retikulocyty) a makarpin negativní buňky (vyzrálé erytrocyty)¹⁴.

Díky kvantitativní vazbě na DNA lze pomocí makarpinu na základě obsahu DNA v buňkách rozlišit průtokovou cytometrií tři fáze buněčného cyklu. To lze graficky



Obr. 4. Histogramy zobrazující fáze buněčného cyklu buněk HL60; je srovnáno barvení MA s komerčně dostupným fluorochromem DRAQ5. Graf znázorňuje intenzitu fluorescence (osa x) vs počet buněk vykazujících danou hodnotu fluorescence (osa y). Intenzita fluorescence byla měřena na průtokovém cytometru Cytomics 500 (Beckman Coulter, Inc.). K excitaci byl použit modrý argonový laser (488 nm) a fluorescence DRAQ5 byla detegována v kanále FL4, MA v kanále FL3 (oba v lineární škále). Je patrné, že vazba MA i DRAQ5 na DNA je kvantitativní (stechiometrická) a umožňuje rozlišit tři základní fáze buněčného cyklu – G_0/G_1 – S – G_2/M

znázornit počtem bodů, odpovídajících jednotlivým buňkám (osa y), které prošly měřicí zónou cytometru v závislosti na intenzitě fluorescence v jednotlivých buňkách (osa x) (obr. 4). V první fázi (G_0/G_1) buňka obsahuje základní množství DNA, (2 sady chromosomů u diploidních buněk, jedna u haploidních), v druhé fázi (S) dochází k duplikaci genetické informace (syntéze DNA) aniž by se počet buněk měnil, což se odráží v rostoucí intenzitě fluorescence jednotlivých buněk. Na konci této fáze buňky obsahují dvojnásobné množství DNA (4 sady chromosomů u diploidních buněk, 2 sady u haploidních). Ve třetí fázi (G_2/M) se množství DNA nejdříve udržuje na dvojnásobné hodnotě, intenzita fluorescence je tedy také dvojnásobná oproti fázi G_0/G_1 . Nakonec dochází k rozdělení genetického materiálu, k mitóze, přičemž množství DNA v buňce klesne na základní úroveň (2 sady chromosomů u diploidních buněk, jedna u haploidních). Využitelnost MA pro studium buněčného cyklu jsme srovnávali s fluorochromem DRAQ5 (obr. 4). Porovnali jsme rovněž emisní spektra MA a DRAQ5 vázaných na buňky HL-60 na průtokovém cytometru Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Inc.)¹⁴. Zatímco fluorescence DRAQ5 je detegovatelná v kanálech FL4 a FL5, MA emituje do kanálů FL2-FL5. Vyhodnocením DNA histogramů v programu Multicycle for Windows (Phoenix Flow Systems) se ukázalo, že oba fluorochromy značí DNA zcela srovnatelně, navíc MA je možno detegovat i v kanálech FL2 a FL3, tedy i na nejjednodušších cytometrech.

7. Závěr

Kvartérní benzo[c]fenanthridinové alkaloidy jsou přírodní látky, které jsou mnoho let studovány z hlediska svých biologických vlastností zahrnujících např. antiproliferační, antimikrobiální a protizánětlivý efekt. Tato práce upozorňuje na jejich další potenciál pro praktické využití, jejich barevnost a schopnost fluorescence. Kombinace vlastnosti primární fluorescence a schopnosti interagovat s buněčnými strukturami otevírá možnost uplatnění těchto alkaloidů jako specifických fluorescenčních sond využitelných pro fluorescenční mikroskopii a průtokovou cytometrii. Schopnost rychle pronikat do živých buněk, vázat se na DNA kvantitativně a tím značit jádro včetně možnosti analýzy buněčného cyklu, spolu s červenou fluorescencí excitovatelnou argonovými lasery obsaženými v běžných průtokových cytometrech, řadí především MA mezi skupinu poměrně málo zastoupených, ale široce využitelných supravitalních DNA sond.

Tato práce vznikla za podpory MŠMT ČR (VZ MSM0021622415 a LC 06077) a GA ČR (525/08/0819).

LITERATURA

- Dostál J., Slavík J., v knize: *Studies in Natural Products Chemistry* (Atta-ur-Rahman, ed.) 27, str. 155. Elsevier, Amsterdam 2002.
- Dostál J., Slavík J.: *Chem. Listy* 94, 15 (2000).
- Dostál J., Potáček J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 55, 2840 (1990).
- Suhomelová J., Bochořáková H., Paulová H., Musil P., Táborská E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 283 (2007).
- Zdařilová A., Malíková J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: *Chem. Listy* 100, 30 (2006).
- Vavrečková C., Ulrichová J.: *Chem. Listy* 88, 238 (1994).
- Šimánek V., v knize: *The Alkaloids*. (Brossi A, ed.), 26., str. 185. Academic Press, Orlando 1985.
- Kovář J., Šimek K., Kožoušková E., Klukanová H.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 50, 1312 (1985).
- Kovář J., Stejskal J., Paulová H., Slavík J.: *Collect. Czech Chem. Commun.* 51, 2626 (1986).
- Walterová D., Preininger V., Grambal F., Šimánek V., Šantavý F.: *Heterocycles* 14, 597 (1980).
- Roshchina V. V.: *Allelopathy J.* 16, 31 (2005).
- Holy J., Lamont G., Perkins E.: *BMC Cell Biol.* 7, 13 (2006).
- Slaninová I., Táborská E., Bochořáková H., Slanina J.: *Cell Biol. Toxicol.* 17, 51 (2001).
- Slaninová I., Slanina J., Táborská E.: *Cytometry, Part A* 71A, 700 (2007).
- Maiti M., Das S., Sen A., Das A., Kumar G. S., Nandi R.: *J. Biomol. Struct. Dyn.* 20, 455 (2002).
- Eftink M. R., Ghiron C. A.: *Anal. Biochem.* 114, 199 (1981).

17. Weiss D., Baumert A., Vogel M., Roos W.: *Plant Cell Environ.* 29, 291 (2006).
18. Sen A., Maiti M.: *Biochem. Pharmacol.* 48, 2097 (1994).
19. Vlčková M., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V.: *Electrophoresis* 26, 1673 (2005).
20. Bai L. P., Zhao Z. Z., Cai Z. W., Jiang Z. H.: *Bioorgan. Med. Chem.* 14, 5439 (2006).
21. Saran A., Srivastava S., Coutinho E., Maiti M.: *Indian J. Biochem. Biophys.* 32, 74 (1995).
22. Schmeller T., LatzBruning B., Wink M.: *Phytochemistry* 44, 257 (1997).
23. Stiborová M., Šimánek V., Frei E., Hobza P., Ulrichová J.: *Chem.-Biol. Interact.* 140, 231 (2002).
24. Toušek J., Dostál J., Slaninová I., Táborská E.: *11th Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry, Brno*. Book of Abstracts (Potáček M., Dostál J., ed.), poster no. PO-18.
25. Shapiro H. M.: *Practical Flow Cytometry*. 4. vyd. Wiley-Liss. John Wiley & Sons, New Jersey 2003.
26. Haugland R. P.: *The Handbook, A Guide of Fluorescence Probes and Labelling Technologies*. 10. vyd. Invitrogen Corp., 2005. <http://probes.invitrogen.com/>, staženo 18. června 2007.
27. Smith P. J., Wiltshire M., Davies S., Patterson L. H., Hoy T.: *J. Immunol. Meth.* 229, 131 (1999).
28. Smith P. J., Blunt N., Wiltshire M., Hoy T., Teesdale-Spittle P., Craven M. R., Watson J. V., Amos W. B., Errington R. J., Patterson L. H.: *Cytometry* 40, 280 (2000).
29. Slavík J., Slavíková L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 20, 356 (1955).
30. Slavík J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 26, 2933 (1961).
31. Slavík J., Slavíková L., Appelt J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 887 (1965).
32. Slavík J., Hanuš V., Slavíková L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 56, 1116 (1991).
33. Ishikawa T., Saito T., Ishii H.: *Tetrahedron* 51, 8447 (1995).

I. Slaninová^a, J. Slanina^b, and E. Táborská^b
^a*Department of Biology,* ^b*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno Czech Republic):* **Fluorescence Properties of Quaternary Benzo[c]phenanthridine Alkaloids and Their Use as Supravital DNA Probes**

Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids (QBAs) are natural products isolated from plants of *Fumariaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae* and *Rutaceae* families. They are intensively studied for their biological activities, but they have also attractive fluorescence properties. Chromophores responsible for fluorescence are fused aromatic ring systems with electron-donor groups containing oxygen (OH, OCH₃, OCH₂O). Recently we have described fluorescent characteristics of QBAs – macarpine (MA), sanguirubine (SR), chelirubine (CHR), sanguilutine (SL), chelilutine (CHL), sanguinarine (SA) and chelerythrine (CHE) – on interaction with living cells. All these alkaloids immediately enter the living cells and MA-, CHR- and SA-bound DNA; they showed a nucleus architecture similar to common DNA dyes. Moreover, MA binds to DNA stoichiometrically and can rapidly report the cellular DNA content in living cells at a resolution adequate for cell cycle analysis. QBAs could be excited by common argon lasers (488 nm) emitting light in the 575–755 nm range. Spectral characteristics of MA allow simultaneous surface immunophenotyping. These characteristics allow multiple applications of the above-mentioned QBAs with significant diagnostic utility. They can be used as supravital fluorescent DNA probes both in fluorescence microscopy and flow cytometry including multiparameter analysis.