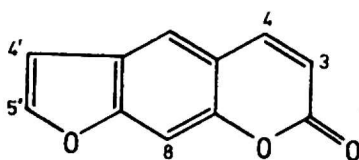


FOTOBIOLOGIA DNA W OBECNOŚCI PSORALENU

Zofia Zarębska

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,
02-532 Warszawa, ul. Rakowiecka 36

Furokumaryny, trójpierścieniowe związki pochodzenia roślinnego, wprowadzono w latach sześćdziesiątych jako narzędzie struktury badań DNA i jego funkcji biologicznych. Do tej pory jedyną dobrze poznaną reakcją fotobiologiczną, uszkadzającą DNA w sposób kontrolowany, była reakcja dimeryzacji tyminy przy udziale promieniowania UV 254. Zastosowanie furokumaryn do badań biologicznych funkcji DNA stało się możliwe dzięki pracom włoskich badaczy pod kierunkiem profesora L. Musajo; prowadzone przez niewielką grupę pracowników Instytutu Farmaceutycznego w Padwie zapoczątkowały wyjaśnienie mechanizmu fotochemicznego przyłączenia furokumaryn do DNA i wydajności reakcji fotochemicznych różnych pochodnych [13].

PSORALEN
(furokumaryna)

Wyniki badań lat siedemdziesiątych przyniosły zrozumienie wielu istotnych reakcji fotochemicznych psoralenu nie tylko z DNA, lecz również z innymi składnikami komórkowymi jak RNA i tRNA, ponadto w latach tych wyprodukowano szereg pochodnych psoralenowych mających zwiększone powinowactwo do DNA i RNA oraz zwiększoną specyficzną w reakcji monofotoaddycji [19].

Fotobiologiczna reakcja furokumaryn z DNA od razu znalazła szerokie zastosowanie, m.in. do:

- kontrolowanego zahamowania replikacji DNA i uszkodzenia dalszych funkcji biologicznych komórki,

- badania struktury chromatyny Eukariontów, a zwłaszcza miejsc genetycznie w niej ważnych,
- wprowadzenia mutacji w drożdżach i bakteriach celem śledzenia uszkodzeń aparatu reperującego DNA,
- fototerapii niektórych chorób skórnych ludzi metodą PUVA.

PSO psoralen i pochodne : 8-MOP (8-metoksy-PSO)
 TMP (4,5',8-trójmetrylo-PSO)

UVA pasmo UV 320 - 400 nm

PUVA łączne działanie (PSO + UVA)

PUVA → DNA → DNA - PSO - fotoaddukt

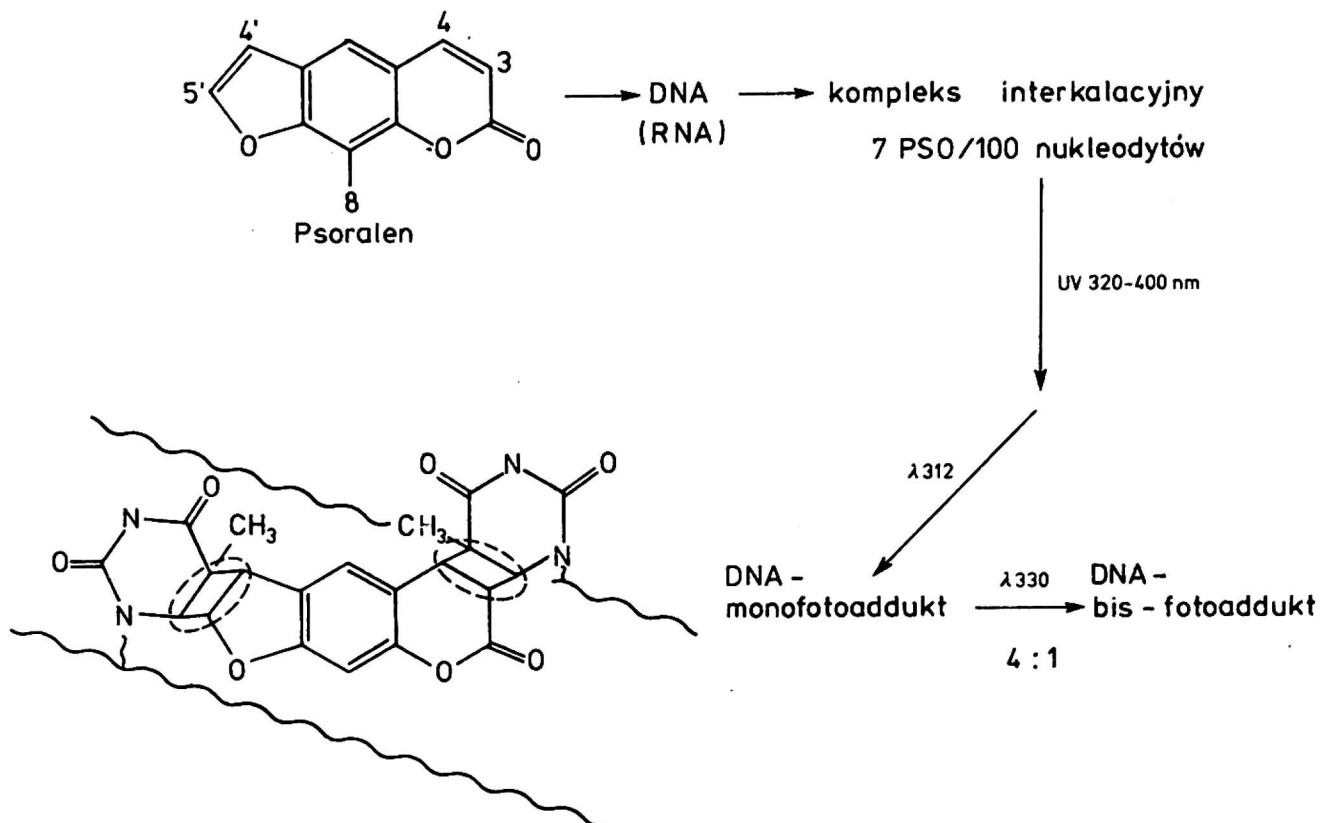
W rysunku 2 umieszczono niektóre specyficzne skróty niezbędne w zaznajomieniu się z tymi metodami badań, związki 8-MOP i TMP to pochodne psoralenowe najczęściej używane.

REAKCJE FUROKUMARYN Z DNA

Fotochemiczne reakcje furokumaryn z DNA poznano początkowo *in vitro*, w rozcieńczonych roztworach wodnych. Psoralen dodany do wodnego roztworu DNA - umiejscawia się w środku helisy DNA, łącząc się z zasadami DNA w kompleks interkalacyjny, średnio około 7 PSO/100 nukleotydów DNA. Zastosowanie światła w pasmie UV 320-400 nm (UVA) prowadzi do reakcji fotochemicznej w kompleksie; wzbudzony psoralen łączy się z wiązaniem 5,6 pirymidyny-tyminy lub cytozyny; fotoreaktywne wiązania psoralenu to 3,4 i 4', 5' - jak zaznaczono we wzorze schematu. Fotoproduktami tej reakcji są dwa typy związków PSO z DNA:

mono-fotoaddukt - PSO związany jednym „bokiem” z zasadą tyminową DNA, „siedzący” tylko na jednej nici (w fotoprzyłączeniu bierze udział albo wiązanie 3,4 - albo 4', 5' - psoralenu);

bis-fotoaddukt - łączący krzyżowo dwie zasady z przeciwległych nici tego samego łańcucha DNA z jednym PSO; przy czym, jak zaznaczono na schemacie, zawsze powstanie bis-fotoadduktu poprzedza powstanie mono-fotoadduktu, a stosunek ilościowy mono- do bis-fotoadduktów kształtuje się jak 1:4, czyli mono-fotoadduktów powstaje 4-krotnie więcej. Bis-fotoaddukt powstaje przez fotoche-



miczne połączenie dwóch pirymidyn z jedną cząsteczką PSO - w miejscu związania pirymidyny w PSO powstaje pierścień cyklobutanowy. Każda z tych dwóch przyłączonych pirymidyn należy do innej nici helisy DNA, stąd nazwa bis-fotoadduktu - wiązanie krzyżowe-cross-link [4].

Ze względów sterycznych jest mało prawdopodobne powstanie bis-fotoadduktu w obrębie jednej nici DNA. Inaczej się dzieje w przypadku fotochemicznego łączenia dimerów tyminy: cyklobutanowy pierścień między sąsiadującymi tyminami powstaje przeważnie w obrębie tej samej nici. Stosunek ilościowy powstających fotochemicznych mono- i bis- fotoadduktów PSO (4:1) można zmieniać: stosuje się pochodne psoralenowe, które ze względów sterycznych łatwiej tworzą mono-fotoaddukty, np. angelicynę [11], albo wykorzystuje się selektywnie niektóre długości fal pasma UVA, będące wierzchołkami widma działania tych fotoproduktów: $\lambda 312$ dla mono- i $\lambda 330$ dla bis- fotoadduktu psoralenu, $\lambda 390$ dla bis-fotoadduktu TMP [8, 10].

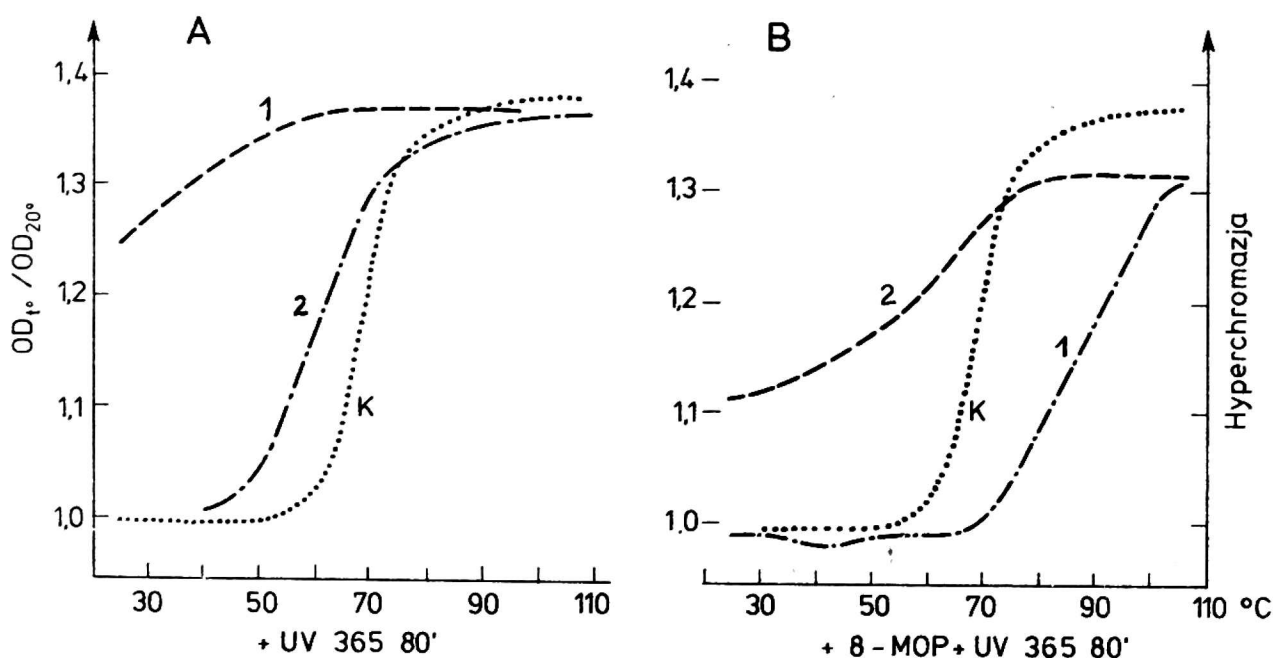
SKUTKI FOTOADDYCJI PSO DO DNA - ZMIANA WŁASNOŚCI DNA

Wprowadzenie obydwu typów związków psoralenowych do DNA prowadzi do usztywnienia jego struktury, gdyż fotoaddukty psoralenowe stanowią zawadę przestrzenną w procesie rozsuwania się dwóch nici

helisy DNA od siebie. DNA-PSO-fotoaddukt poddany denaturacji i renaturacji wykazuje zwiększoną renaturowalność w stosunku do DNA natywnego, a stopień zwiększenia tej renaturowalności może służyć jako wskaźnik ilościowy miejsc zaburzonych w DNA [8]. Zwiększoną odporność na denaturację DNA-PSO-fotoadduktu można badać różnymi metodami fizykochemicznymi.

Metoda profili temperaturowych

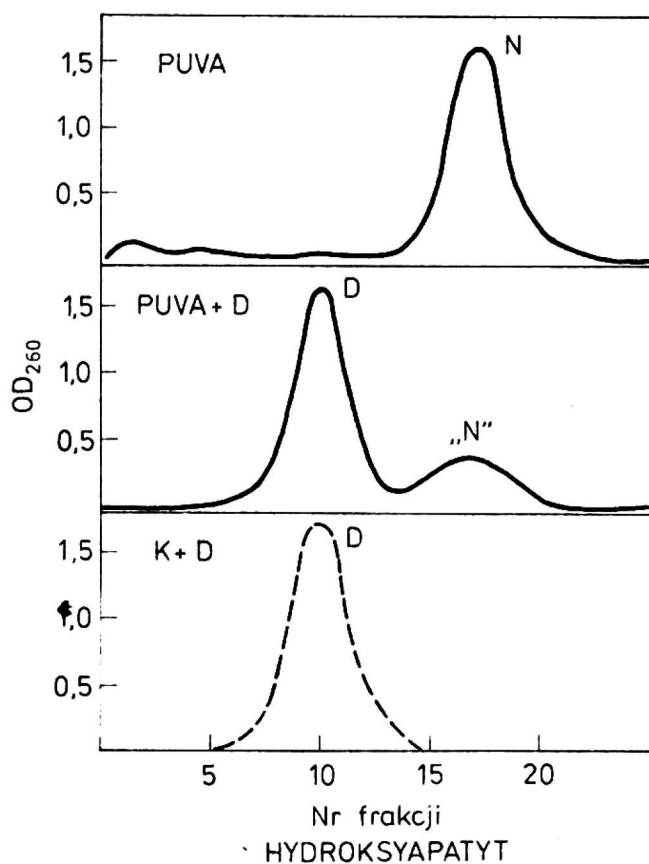
Z interkalujących 7 cząsteczek psoralenu na 100 nukleotydów przyłącza się zaledwie jedna dziesiąta PSO przy wysycającej dawce naświetlania, ale to już wystarcza by DNA-PSO-fotoaddukt uzyskał podwyższoną termostabilność, mierzoną T_m , o 20° ; z rysunku 1 można wyliczyć że T_m denaturacji DNA-PSO-fotoadduktu wynosi 87° , a T_m renaturacji 61° , wobec T_m 66° dla denaturacji natywnego DNA.



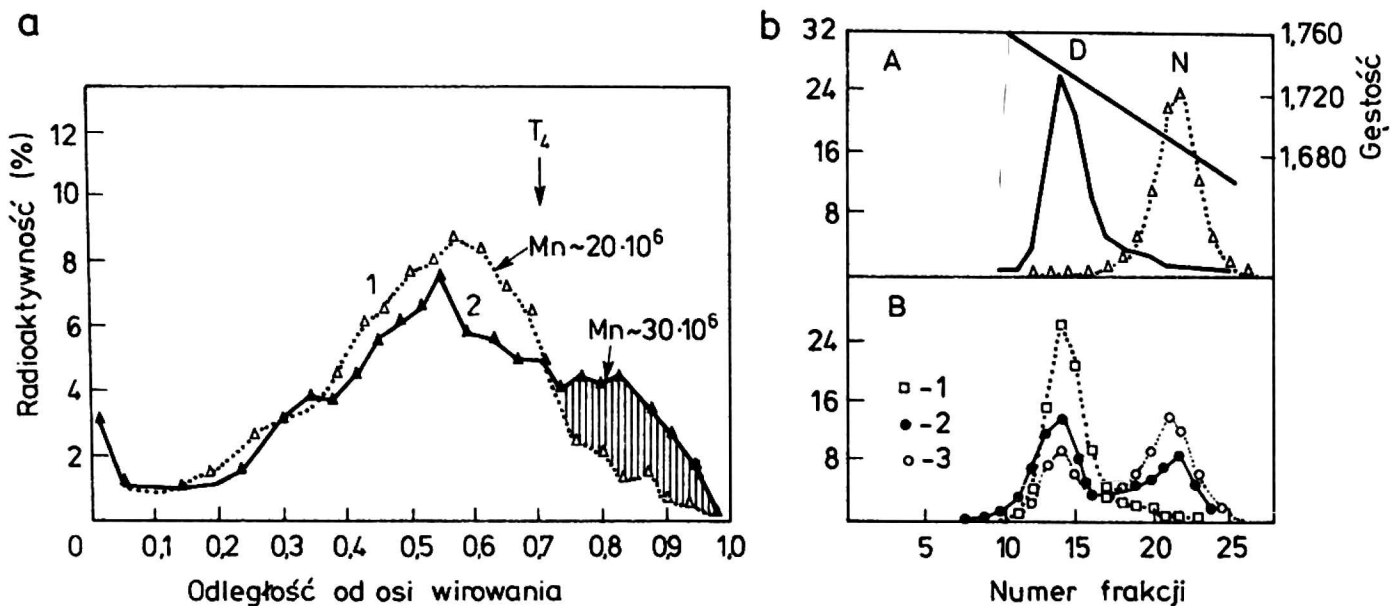
Rys. 1. Termostabilność DNA-PSO-fotoadduktu [wg 23]; DNA z grasicy cielęcej, sonikowane do 5×10^5 daltonów, roztwór wodny, 3 mM NaCl, pH 7, A) - K - kontrola nienaświetlana, denaturacji, 1-krzywa renaturacji, 2 - denaturacja DNA naświetlanego $8 \times 10^5 \text{ J/cm}^2$ UVA B) próbka poddana działaniu PUVA: 40 μg 8 - MOP + 500 g DNA/ml + $8 \times 10^5 \text{ J/m}^2$ UVA; 1 - krzywa denaturacji, 2 - renaturacji

Rozdzielanie na kolumnie hydroksyapatytowej

DNA kontrolne, po denaturacji wymywa się w pasmie DNA - D (dół rys. 2); natomiast DNA z naświetlanej świnki, po denaturacji rozdziela się na dwa pasma: D i „N” (środek rys. 3). DNA we frakcjach pasma „N” odpowiada zachowaniem się DNA natywnemu, wymywa się w tym samym pasmie co (DNA + PUVA) nie poddane denaturacji, w pasmie N (górze rys. 4). Pasma „N” więc odpowiada renaturowalnej frakcji DNA-PSO-fotoaddukt, niby natywnemu DNA.



Rys. 2. Elucja DNA-PSO-fotoadduktu z kolumny hydroksyapatytowej DNA wyekstrahowane ze skóry świnki morskiej [wg 5]; N - pasmo frakcji odpowiadające dwupasmowemu, natywnemu DNA, D - pasmo frakcji odpowiadające jednopasmowemu, zdenaturowanemu DNA; dół (K + D) kontrola nienaświetlana, poddane denaturacji cieplnej - 5 min w 100° następnie 20 min. w lodzie; środek i góra DNA ekstrahowane po działaniu PUVA na świnkę morską ($50 \mu\text{g}/\text{PSO}/\text{cm}^2 + \text{J}/\text{cm}^2 \text{ UVA}$); PUVA obróbka nałożona na kolumnę bez denaturacji; PUVA + D próbka nałożona na kolumnę po denaturacji i renaturacji jw.



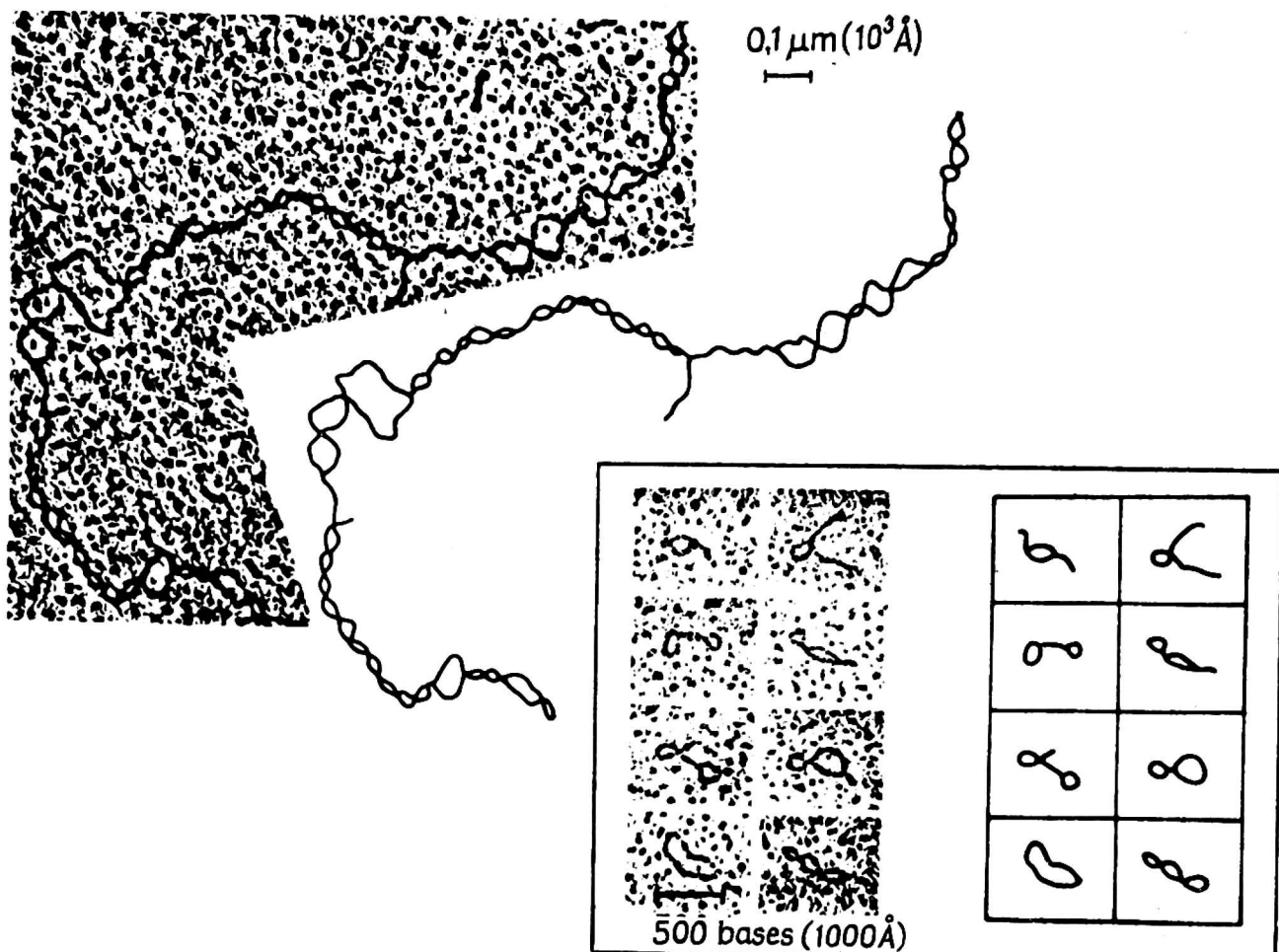
Rys. 3. Wirowanie DNA-PSO-fotoadduktu w gradientach sacharozy i chlorku cezu [wg 12]; DNA wyekstrahowano z naskórka myszy bezwłosej; a - wirowanie w alkalicznym gradiencie sacharozy: 1 - kontrola, 2 - PUVA (8-MOP + 3 J/cm² UVA), M_n - średni ciężar cząsteczkowy, po PUVA wzrasta 1,5-krotnie, ujawniając pasmo w obszarze dwuniciowego DNA, mimo denaturujących warunków wirowania; b - wirowanie w gradiencie chlorku cezu: A - kontrola nienaświetlana, N - natywne DNA, D - denaturowane DNA w pH 12,5 i renaturowane w pH 11 B - DNA z myszy naświetlanych po posmarowaniu psoralenem wzrastającymi dawkami UVA: 1 - 2 J/cm², 2 - 6 J/cm², oraz bez psoralenu, 3 - 12 J/cm² UVA

Wirowanie w alkalicznym gradiencie sacharozy lub chlorku cezu

Obydwie metody wirowania wykazują, że DNA ekstrahowane z myszy, poddanych działaniu PUVA, ujawnia odrębne pasmo w obszarze dwuniciowego, natywnego DNA, mimo denaturujących warunków.

Omówione metody badań fizycznych własności DNA zmienionego przez działanie PUVA wskazują pośrednio na powstawanie wiązań krzyżowych, utrzymujących niby natywną, dwuniciową strukturę DNA, mimo działania czynników denaturujących. Bezpośrednich dowodów istnienia wiązań krzyżowych dostarczyła dopiero metoda mikroskopii elektronowej w 1976 r.

Proces denaturacji formaldehydem powoduje rozsuniecie nici helisy DNA, ale widoczne są wyraźne rejony, gdzie DNA nie mogło ulec rozpleceniu, gdyż jest trzymane przez bis-fotoaddukty psoralenowe. Na wstawce, w powiększeniu 50-krotnym, przedstawiono wybrane miej-



Rys. 4. Zdjęcie DNA-PSO-fotoadduktu w mikroskopie elektronowym [wg 9]; DNA wyizolowane z embrionów muszki owocowej, PUVA - 5 μg/ml TMP + 15 J/cm² UVA (denaturacja: 10% HCOH, 0,02 M węglan sodu, 5 mM EDTA, pH 7, w 70° przez 2 godz)

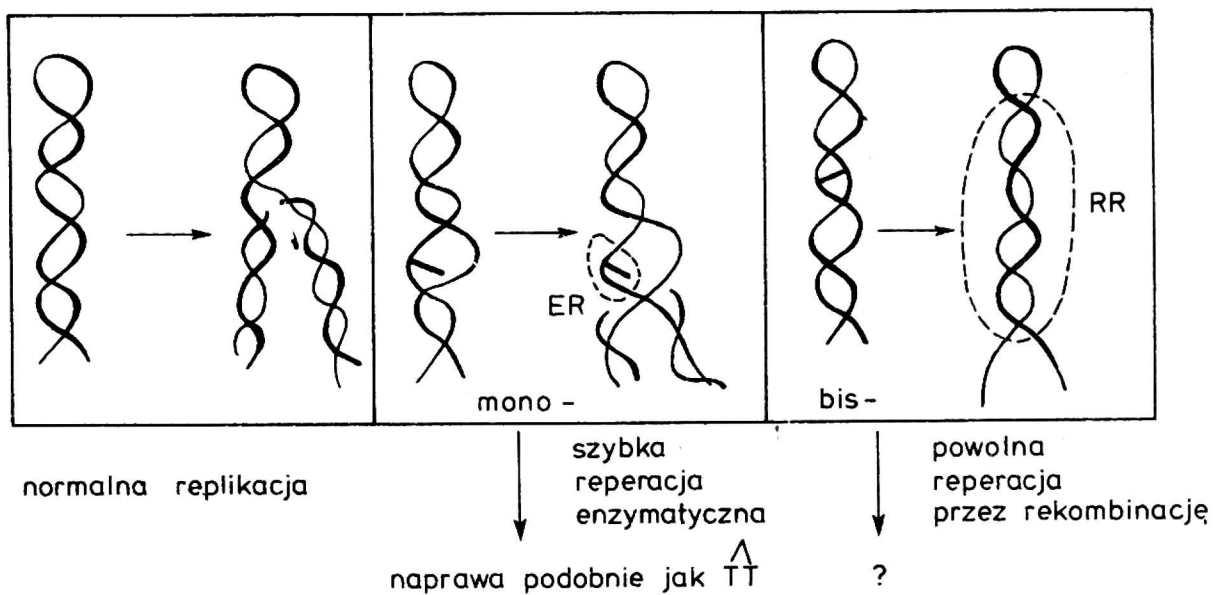
eca rozpleceń DNA sąsiadujące z wiązaniami krzyżowymi - cały splot ma długość około 100 nm, mieści ok. 500 zasad, stąd wyliczono, że od 20 do 100 zasad nie ulega rozpleceniu wokół wiązania krzyżowego.

Badania *in vitro* wykazały, że interkalacja psoralenu następuje preferencyjnie w rejonach DNA bogatych w pary AT, tam też najczęściej należy oczekiwać powstawania wiązań krzyżowych [6]. Stwierdzono ponadto, że wiązania krzyżowe powstają z 3-krotnie większą wydajnością w ściśle upakowanym, np. superhelikalnym (plazmidowym) DNA niż w DNA liniowym [22].

SKUTKI BIOLOGICZNE POWSTAWANIA WIAZAŃ KRZYŻOWYCH W DNA

Już we wczesnych pracach, stosujących PUVA *in vivo*, zaobserwowano zahamowanie syntezy DNA jako pierwsze zakłócenie funkcji biologicznych komórki. Na wszystkich obserwowanych obiektach - w

naskórku ssaków, w bakteriach, i w drożdżach stwierdzano najpierw zahamowanie syntezy DNA, a dopiero później, następczo zahamowanie syntezy RNA i białek. Ponadto badania ilościowe wykazały największą aktywność PSO-fotoadduktów w DNA - 100, w RNA - 28, w białkach - 16 odpowiednio [15]. Poznanie struktury i udowodnienie istnienia wiązania krzyżowego, doprowadziło do zrozumienia sekwencji zdarzeń zakłócających cykl życiowy komórki. Jak wynika z rysunku 5 oraz ze zdjęcia w mikroskopie elektronowym (rys. 4), wiązanie krzyżowe zapobiega rozsunięciu się od kilkunastu do stu par zasad sąsiadujących z wiązaniem krzyżowym, czyli w tym miejscu następuje zatrzymanie się syntezy DNA de novo, zahamowanie replikacji. Zahamowanie syntezy DNA jest czasowe i ulega zupełnemu odwróceniu, jeśli stopień fotoreakcji nie przekroczy śmiertelnego progu dla życia komórki. Stwierdzono że w procesie odwrócenia biorą udział te same enzymy reperujące, co w procesie naprawy dimerów tyminy, szczególnie w wycinaniu i naprawie odcinków DNA z mono-fotoadduktami, natomiast usuwanie i naprawa miejsc z wiązaniami krzyżowymi wymaga więcej czasu i prawdopodobnie innej drogi naprawy [3].



Rys. 5. Schemat reperacji DNA-PSO-fotoadduktu in vivo; w środku - ER - enzymy reperujące usuwają szybko mono-fotoaddukt, po czym replikacja przebiega normalnie, prawa klatka - bis-fotoaddukt nie pozwala się rozpleść całemu odcinkowi DNA i w tym miejscu następuje zahamowanie dalszej syntezy

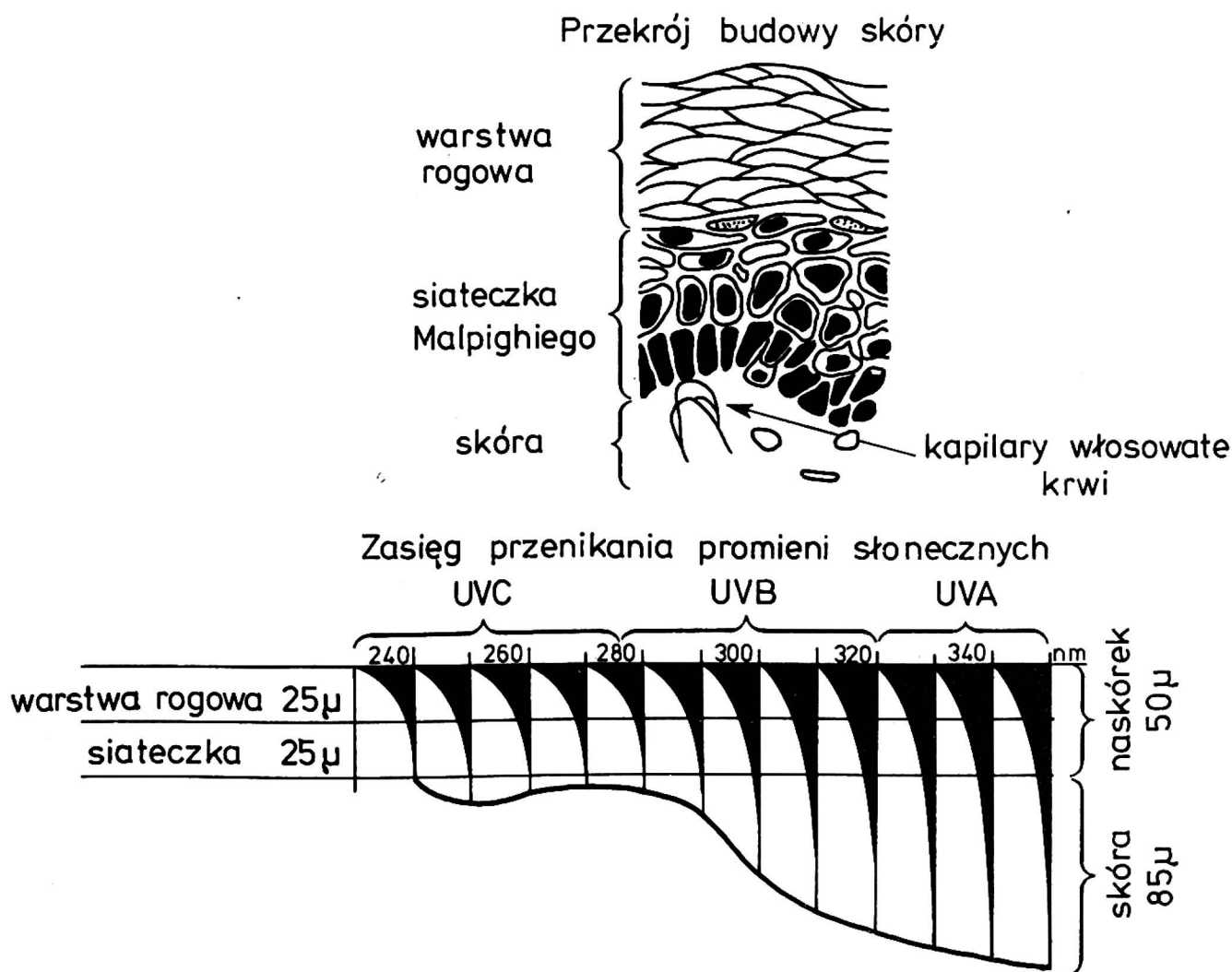
ZASTOSOWANIE PUVA DO TERAPII

Jedną z wrodzonych chorób ludzkich jest łuszczyca, przejawiająca się m.in. w nadmiernej proliferacji naskórka skóry, w ost-

rych stanach chorobowych następuje 7-krotnie przyspieszenie namnażania komórek warstwy podstawnej - zamiast 28 dni cykl podziałowy komórek trwa 3-4 dni. Zastosowanie terapii PUVA wstrzymuje nadmierną syntezę DNA, co powoduje zahamowanie szalonego podziału komórek, po czym okresy remisji są długotrwałe - od 6 miesięcy do kilku lat [14].

Fotochemoterapia PUVA - pacjent pobiera PSO doustnie po 2 godz. przed naświetlaniem 0,6 mg 8-MOP/kg wagi ciała, naświetlanie - lampami emitującymi UVA dawką jednorazową 1,5 - 5 J/cm², seanse raz lub dwa razy w tygodniu, w okresie 4-8 tygodni, dawka kumulacyjna 37 J/cm² UVA. Reakcję PUVA z powodzeniem zastosowano w terapii ludzi gdyż:

- pasmo promieniowania UVA przenika dostatecznie głęboko w skórę ludzką,
- stosowaniu UVA nie prowadzi do zrakowacenia skóry przy ograniczonym czasie naświetlania,



Rys. 6. Przenikanie światła ultrafioletowego przez skórę ludzką [wg 21].

- psóralen po podaniu doustnym utrzymuje się w stanie niezmiennym dostatecznie długo, aby zadziałać w fotoreakcji w okresie 2-3 godz. po spożyciu [17].

Szczególnie ważna w terapii jest warstwa podstawna naskórka, zawierająca dzielące się komórki i kapilary włosowate doprowadzające krew zaznaczone w górnej części rysunku 6; dolna część rysunku 9. przedstawia zasięg przenikania promieni UV 230-360 nm padających prostopadle do powierzchni przedramienia ludzkiego. Kłamry u góry zaznaczają podział promieniowania UV ze względu na jego skuteczność biologiczną:

UVC - poniżej 285 nm, nie dociera do nas ze Słońca, emitują go lampy bakteriobójcze i inne sztuczne źródła światła.

UVB - 285-320 nm, tzw. promieniowanie erytemalne (rumieniowe), wywołujące odczyn rumieniowy skóry, nadmiar tego promieniowania jest szkodliwy ze względu na przyspieszenie procesów starzenia się skóry i wzmożenie procesów rakowacenia.

UVA - 320-400 nm, tzw. pigmentujące, jest ono 100-krotnie mniej erytemalne od UVB, najgłębiej penetruje skórę i wzbudza psóralen.

BADANIA MECHANIZMÓW TERAPII PUVA

Terapia PUVA cofa ostre stany chorobowe łuszczycy oraz leczy niektóre inne dermatozy, ale nie prowadzi do całkowitego ich wyleczenia. Stąd istnieje konieczność bardzo wnikliwego kontrolowania przebiegu terapii, zwłaszcza że częste powtarzanie leczenia może doprowadzić do powstania procesów rakotwórczych. Od roku 1973, gdy zaczęto stosować terapię PUVA na większą skalę w USA, Austrii, Szwecji i Japonii, w badania te zaangażowało się tysiące lekarzy i naukowców [14]. Instytut Biochemii i Biofizyki PAN podjął ścisłą współpracę z Kliniką Dermatologiczną AM w Warszawie rozpoczynając od roku 1975 badania nad fotobiologią DNA w obecności psóralenu. Interesuje nas zwłaszcza poznanie skali czasowej i mechanizmu reperacji DNA-PSO-fotoadduktu w organizmie ludzkim. Dotychczasowe badania wykazały jak szybko i w jakiej ilości PSO ulega przyłączeniu, jak długo zahamowany jest proces syntezy DNA de novo, ale np. nie wiadomo - jak długo bis-fotoaddukty mogą tkwić w uszkodzonej komórce (a jeszcze nie obumarłej), jak długo potencjalnie jeszcze mogą oddziaływać na nią lub na jej potomstwo.

Niektórych danych nt. skali czasowej procesów reperacyjnych dostarczyły obserwacje histologiczne i autoradiograficzne naskórka myszy bezwłosej po działaniu PUVA. Bezpośrednio po PUVA wstrzykuje się myszy (dootrzewnowo) znakowane trytem tymidynę, cytydynę i histydynę, co pozwala z grubsza oznaczyć stopień i miejsca syntezy DNA, RNA i odpowiednio białek. W ten sposób wykazano, że synteza DNA ulega zahamowaniu już w 2-6 godz. po zadziałaniu PUVA a trwa do 7 dni wobec 25 dni normalnego cyklu życiowego komórek naskórka. Synteza białka podlega natomiast zahamowaniu dopiero po 48-72 godzinach [7].

Obserwacje te dotyczą wprost zakłóceń syntezy DNA, RNA, czy białek pod wpływem PUVA, natomiast jedynie pośrednio wskazują na los fotouszkodzeń; brak syntezy DNA przypisuje się obecności fotouszkodzeń, odnowienie syntezy DNA po pewnym czasie - usunięciu, reperacji tych fotouszkodzeń. Niestety autoradiografia po PUVA nie „powie” nic o losie tych fotoadduktów, które pozostały po procesie odnowionej syntezy, które nadal tkwią w uszkodzonej komórce po jej przeżyciu. Ponadto wnioski z działania PUVA na naskórek myszy bezwłosej nie dotyczą skóry ludzkiej.

Stąd, poszukiwania idą w kierunku znalezienia metody pozwalającej bezpośrednio obserwować losy fotoadduktów in situ w skórze ludzkiej. W Klinice Dermatologicznej AM powstał pomysł zastosowania metody immunofluorescencyjnej (IF) pośredniej do obserwacji losów DNA-PSO-fotoadduktu. Projekt wypłynął od prof. T. Chorzelskiego, Kierownika Pracowni Immunopatologii tej Kliniki, a wykonawcami były: dr M. Jarząbek-Chorzelska, dr G. Rzęsa - pracownice Kliniki oraz Zofia Zarębska z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN.

METODA IMMUNOFLUORESCENCJI POŚREDNIEJ W BADANIACH PUVA

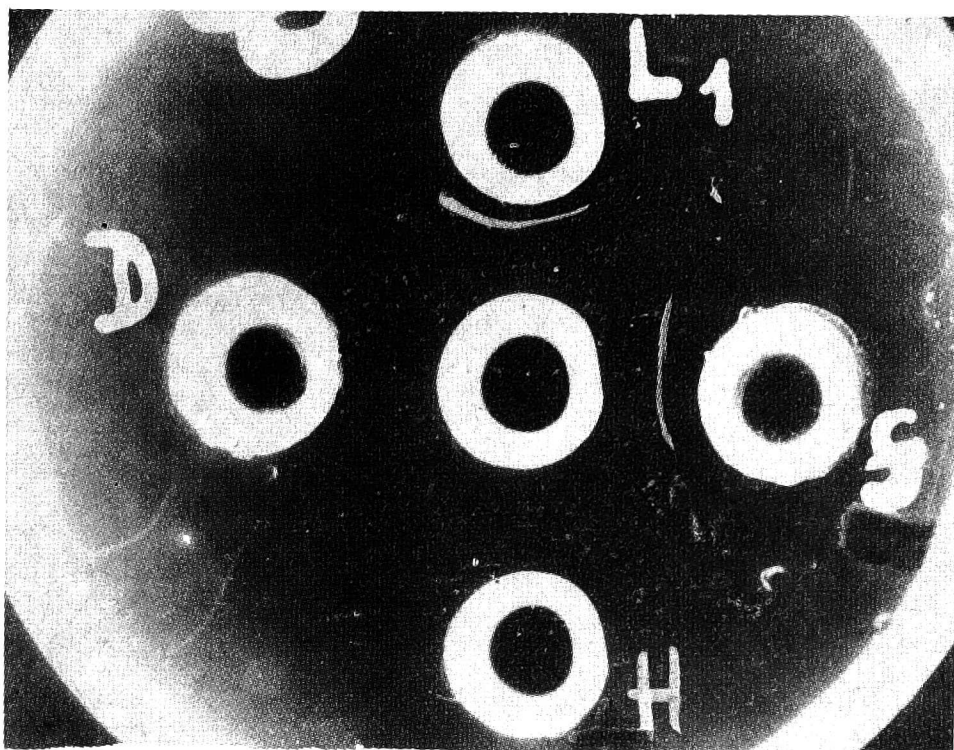
Do stosowania tej metody niezbędne są przeciwciała, w danym przypadku anty-DNA-8-MOP-fotoaddukt, które osadzają się specyficznie w tych miejscach gdzie są dostępne DNA-8-MOP-fotoaddukty. Immunizując królika roztworem zawierającym krótkołańcuchowe (sonikowane) DNA, z optymalnie przyłączoną ilością fotoadduktów, otrzymano surowicę zawierającą poszukiwane przeciwciała. Sprawdzone ich specyficzność metodą immunodyfuzji na agarozie. Łańcuch dwupasmowego DNA stanowi wielką cząsteczkę i może potencjalnie zawierać wiele determinant antygenowych: sonikowany łańcuch DNA, zde-

naturowany łańcuch DNA, inne fotoprodukty niż 8-MOP-fotoaddukty, np. dimery tyminy. Linie precypitacyjne widoczne na rysunku 7, powstające na wskutek wytrącenia immunosurowicy tworzą się jedynie w pobliżu studzienek L₁ i S, natomiast nie powstają w pobliżu studzienek D i H. Brak linii precypitacyjnych wobec D i H oraz wobec antygeny DNA-8-MOP-fotoaddukt strawiony dezoksyrybonukleazą upoważnia nas do stwierdzenia, że badana immunosurowica zawiera przeciwciała specyficznym skierowane przeciw długiemu łańcuchowi DNA z 8-MOP-fotoadduktami [23].

Uzyskanie przeciwciał specyficznym skierowanych przeciw DNA-8-MOP-fotoadduktowi pozwoliło na zastosowanie metody IF pośredniej do badania reakcji PUVA in situ w sposób następujący: utrwalony skrawek tkanki, po reakcji PUVA inkubuje się z immunosurowicą króliczą, zawierającą anty-DNA-8-MOP-fotoaddukt. Tę surowicę odmywa się po 15 minutach i inkubuje się z przeciwciałem kozim przeciwko IgG króliczemu, wyznakowanym pochodnym fluoresceiny - FITC. FITC-przeciwciała osadzają się w kompleksie jedynie w tych miejscach gdzie powstaje nieodmyta surowica królika, wyznaczając w ten sposób miejsca, gdzie zaszła reakcja PUVA z DNA. Po wypłukaniu i wysuszeniu, skrawki ogląda się w mikroskopie fluorescencyjnym, miejsca zawierające FITC-przeciwciała świecą na zielono - wyznaczając wprost lokalizację tkankową DNA-8-MOP-fotoadduktu.

Wiciowce *Crithidia luciliae* wybrano jako obiekt modelowy ze względu na to że posiadają one olbrzymi mitochondrion wypełniony DNA, z nikłą zawartością białek histonowych. Rozmiary kontrolne nasączone roztworem 8-MOP a nienaświetlane, bądź tylko naświetlane UVA bez PSO nie wykazały świecenia. Podobne wyniki uzyskano na skrawkach wątroby szczurzej, po zabiegach PUVA i zastosowaniu IF pośredniej, obserwowano świecenie jąder komórek wątrobowych.

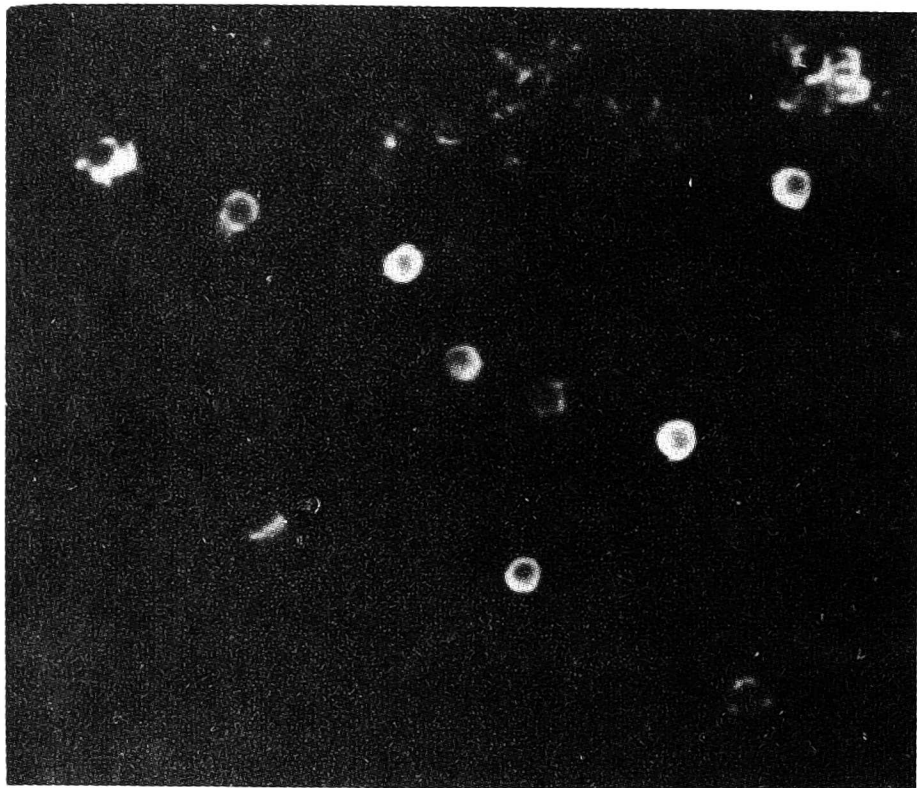
Trudności z zastosowaniem tej metody napotkano przy przejściu na układy in vivo. Mysz bezwłosa po zastrzyku podskórnym z roztworem 8-MOP 15 mg/kg naświetlano 35 J/cm² UVA, następnie z naświetlanego grzbietu pobierano wycinek skóry, który po utrwaleniu poddawano procedurze IF pośredniej. Obserwowano nieswoiste warstwy rogowej naskórki i swoiste świecenie jąder komórek warstwy podstawnej. Jednakże świecenie warstwy podstawnej uzyskiwano nie zawsze a ponadto wymagało to zastosowania wysokich stężeń surowicy króliczej (rozcieńczenie 1:4). Przyczyna niepowodzeń jest jak dotąd niewyjaśniona, albo ilość powstających fotoadduktów jest zbyt ma-



Rys. 7. Specyficzność anty-DNA-8-MOP-fotoadduktu [wg 23]. Płytką agarową zawiera studzienki z potencjalnymi antygenami: L_1 - długiłańcuchowe DNA-8-MOP-fotoaddukt, S - sonikowane DNA-8-MOP-fotoaddukt, D - DNA-TT, z dimerami tyminy, H - DNA zdenaturowane ciepłnie, środkowa studzienka zawiera immunosurowicę z uodparnianego królika



Rys. 8. Powstawanie DNA-8-MOP-fotoadduktów w wiciowcach; rozmaz komórek nasączono alkoholowym roztworem 8-MOP, $0,3 \mu\text{g}/\text{plamkę}$, naświetlano UVA $80 \text{ J}/\text{cm}^2$, procedura IF pośredniej jak opisano w tekście. Miejsca świecenia wyznaczają miejsca fotoreakcji 8-MOP z DNA



Rys. 9. Powstawanie DNA-8-MOP-fotoadduktów w limfocytach. Do zawiesiny limfocytów dodawano 5 ug 8-MOP/ml, naświetlanie 15 J/cm² UVA, procedura IF pośredniej na rozmazach limfocytów na szkiełku podstawowym

ła, albo niedostępna do reakcji z przeciwciałami. W przeciwieństwie do niepowodzeń z zastosowaniem IF pośredniej do reakcji PUVA w skórze, udało się uzyskać pozytywną reakcję na limfocytach, wyizolowanych z krwi obwodowej ludzkiej. Uzyskanie pozytywnej reakcji z limfocytami stwarza podstawy do kontynuowania badań z zastosowaniem DNA-8-MOP-fotoadduktów w immunofluorescencji celem uzyskania dostatecznie czułego testu, przydatnego w obserwacjach klinicznych.

BADANIA CHROMATYNY

Zdolność psoralenu do tworzenia wiązań krzyżowych w strukturze DNA nieoczekiwanie okazała się przydatna w badaniach chromatyny eukariontów [2, 20]. Różnorodne metody wskazywały na to, że chromatyna posiada swoistą architekturę, złożoną z helisy DNA oplatającą dookoła kłębuszki białek histonowych, tworząc podjednostki - nukleozomy. Poznanie struktury nukleozomów prowadzi do zrozumienia funkcji chromatyny w trakcie wielu ważnych czynności życiowych komórki.

Badania *in vivo* prowadzono na całych komórkach w hodowli tkankowej bądź na wyizolowanych jądrach z zarodków muszki owocowej lub z wątroby mysiej. Obiekty te poddawano wysycającemu działaniu PUVA używając znakowany $^3\text{H-TMP}$ (TMP^*). Następnie wyizolowane jądra poddawano trawieniu przez nukleazę mikrokokałną w celu określenia długości trawionych odcinków na żelu oraz ilości wyciętego TMP^* . Wyniki uzyskane niezależnie od siebie w dwóch pracowniach, wykazały, że:

- TMP^* przyłącza się w mniejszym stopniu do chromatyny *in vivo* niż do wyizolowanego, oczyszczonego DNA;
- piętno stwierdza się prawie wyłącznie w odcinkach między nukleozomami, pozbawionych histonów;
- długości odcinków między znakowaniami TMP^* wynoszą około 200 par zasad, co się zgadza z długością nukleozomu wyznaczoną innymi metodami.

Następnym krokiem, wykorzystującym wiążące działanie psoralenu jest próba utrwalenia tych odcinków DNA, które kodują informacyjne RNA. Zadziałano PUVA na DNA fagowe w układzie *in vitro* w momencie transkrypcji przy użyciu RNA polimerazy DNA zależnej [18]. Po fotoreakcji PUVA wyizolowano z układu odcinki DNA kowalencyj-

nie związane z nowopowstałymi łańcuchami RNA. Dalszym zamierzeniem jest zbadanie sekwencji tych odcinków DNA, które specyficznie się łączą z RNA w momencie transkrypcji.

ZAKOŃCZENIE

Obok terapii PUVA istnieje inna metoda fotobiologiczna zwana działaniem fotodynamicznym. Polega ona na współdziałaniu światła w zakresie widzialnym oraz barwników - np. proflawiny (3,6-dwuamino-akrydyny), lub czerwieni obojętnej (3-amino-7-dwumetyloamino-2-metylo-fenazyny). Barwnik absorbujący światło działa na substrat biologiczny nie bezpośrednio, jak w terapii PUVA, lecz poprzez wzbudzony tlen w stanie singletowym. Spektrum działania reakcji fotodynamicznej jest o wiele szersze niż działanie PUVA - foto-utlenianiu ulegają nie tylko zasady nukleozydowe w DNA, ale i aminokwasy białkowe oraz lipidy wchodzące w skład błon komórkowych, ponadto w znacznym stopniu ulegają pękaniu łańcuchy DNA. Końcowym efektem biologicznym jest zahamowanie podziału komórek oraz spadek infekcyjności wirusów DNA, co wykorzystano w leczeniu infekcji skóry i błon śluzowych spowodowanych wirusem opryszczki - Herpes simplex [1].

Aczkolwiek badania kliniczne wykazały w licznych przypadkach całkowite zahamowanie infekcji wirusowej, istnieje poważna kontrowersja co do stosowania terapii fotodynamicznej. Bowiem istotnym działaniem ubocznym tej terapii jest uszkodzenie zdrowych komórek, niezakażonych wirusem, co potencjalnie może doprowadzić do zmian rakotwórczych. Klinicyści stoją więc przed wyborem: leczenia infekcji wirusowych, gdyż nieleczone prowadzą do zmian rakotwórczych, a ryzykiem stosowania metod fotochemoterapeutycznych, które oprócz skutecznego działania mogą dawać uboczne efekty, potencjalnie rakotwórcze.

Spośród wielu barwników lub trójpierścieniowych związków interkalujących, używanych do badań DNA - psoralen i jego pochodne wyróżniają się wszechstronnością zastosowań zarówno w badaniach struktury DNA w żywej komórce, jak i w medycynie [16, 17]. Zastosowanie PUVA do leczenia dermatoz skóry należy do najbardziej udanych terapii fotobiologicznych, ze względu na swą małą toksyczność i brak długotrwałych skutków ubocznych. Omówione wybrane przykłady świadczą o różnorodnych możliwościach zastosowań tej metody fotobiologicznej, do której zalet należy:

- jest względnie prosta i tania metodycznie,
- jest dobrze poznana na poziomie molekularnym a jej produktami są głównie dwa typy fotoadduktów do DNA,
- prowadzi do powstania wiązań lokalnych nie uszkadzających pozostałej struktury DNA, w przeciwieństwie do reakcji fotodimeryzacji, która powoduje m.in. rozrywanie wiązań nukleozydowych,
- produkty tej reakcji są trwałe i wytrzymują powszechnie stosowane procedury izolowania badanego materiału. Jak każda z sukcesem stosowana metoda ma swoje „pułapki”, na które należy zwrócić szczególną uwagę przy rozpoczynaniu pracy w nieznanym obiekcie:
- docieranie wystarczającej dawki promieniowania UVA w pożądanym miejscu reakcji;
- powstanie innych produktów reakcji niż poznane dotąd DNA-fotoaddukty, np. niezbadane są dotąd wiązania krzyżowe PSO między białkami a kwasami nukleinowymi w ściśle upakowanych strukturach biologicznych [11].

Pragnę podziękować Panu Profesorowi Davidowi Shugarowi za wprowadzenie oraz wszechstronne kierownictwo w tematyce fotobiologicznej. Niniejszą pracę wykonano w ramach problemu węzłowego 09.7 (temat - 09.7.1.1.4.1,) Polskiej Akademii Nauk.

LITERATURA

1. Bockstahler L.E., Cochill T.P., Hellman K.B., Lytle C.D., Roberts J.E.: *Pharmacology and Therapeutics*, 4, 473-499, 1980
2. Cech T., Pardue M.L.: *Cell*, 11, 631-640, 1977
3. Cole R.S., Levitan D., Sinden R.R.: *J. Mol. Biol.*, 103, 39-59 1976
4. Dall'Acqua F., Marciani S., Rodighiero G.: *FEBS Letters*, 9, 121-123, 1970
5. Dall'Acqua F., Marciani S., Vedaldi D., Rodighiero G.: *FEBS Letters*, 27, 192-194, 1972
6. Dall'Acqua F., Vedaldi D., Recher M.: *Photochem. Photobiol.*, 27, 33-36, 1978
7. Epstein J.H., Fukuyama K.: *Photochem. Photobiol.*, 21, 325-330 1975
8. Fujita H., Sano M., Suzuki K.: *Photochem. Photobiol.*, 29, 71-74, 1979
9. Hanson C.V., Shen C.K.J., Hearst J.E.: *Science*, 193, 62-64, 1976
10. Johnston B.H., Johnson M.A., Moore C.B., Hearst J.E.: *Science* 197, 906-908, 1977

11. Kittler L., Hradečna Z., Löber G.: *Studia biophysica* (Berlin), 66, 237-241, 1977
12. Ley R.D., Grube D.D., Fry R.J.M.: *Photochem. Photobiol.*, 25, 265-268, 1977
13. Musajo L., Rodighiero G.: *Photochem. Photobiol.*, 11, 27-35, 1970
14. Parrish J.A., Fitzpatrick T.B., Tanenbaum L., Pathak M.A.: *N. Engl. J. Med.*, 291, 1207-1212, 1974
15. Pathak M.A., Krämer D.M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 195, 197-206, 1969
16. Rodighiero G., Dall'Acqua F.: *Photochem. Photobiol.*, 24, 647-653, 1976
17. Scott B., Pathak M.A., Mohn G.: *Mutation research*, 39, 29-74, 1976
18. Shen C.K.J., Hearst J.E.: *Nucleic Acid Res.*, 5, 1429-1441, 1978
19. Song P.S., Tapley K.J. Jn: *Photochem. Photobiol.*, 29, 1177-1197, 1979
20. Wieseahn G.P., Hyde J.E., Hearst J.E.: *Biochemistry*, 16, 925-932, 1977
21. Wiskeman A.: *An introduction to photobiology* (C.P. Swanson. Ed.), Prentice Hall, 81-98, 1969
22. Yoakum G.H., Cole R.S.: *Biochim. Biophys. Acta*. 521, 529-546, 1978
23. Zarębska Z., Jarząbek-Chorzelska M., Rzęsa G., Chorzewski T.: *Photochem. Photobiol.*, 27, 37-42, 1978

З. Зарембска

ФОТОБИОЛОГИЯ ДНК В ПРИСУТСТВИИ ПСОРАЛЕНА

Р е з ю м е

Введение фотoadдуктов псоралена в ДНК является методом широко используемым в молекулярно-биологических исследованиях ДНК. В статье излагаются химические основы этой реакции и методы определяющие степень фотосоединения псоралена с ДНК как *in vitro* так и *in vivo*. Рассматривается также использование псоралена в качестве зонда структуры хроматина и фототерапевтического лекарства при лечении кожных заболеваний.

Z. Zarębska

PHOTOBIOLOGY OF DNA IN THE PRESENCE OF PSORALEN

S u m m a r y

The method of introducing psoralen photoadducts to DNA has been widely used in studies of molecular biology of DNA. The chemical basis of this reaction and the methods for detection of the range of the in vitro and in vivo photoreaction of psoralen with DNA are presented. The application of psoralen as a probe of chromatin structure and as a drug in the phototherapy of dermatologic disorders of the skin are discussed.