

FLUORESCENČNÁ SPEKTROSKOPIA SUPRAMOLEKULOVÝCH KOMPLEXOV TIOLOVANÝCH CYKLODEXTRÍNOV A KUMARÍNU C153 AKO SIMULÁCIA PROTEÍNOVÉHO AKTÍVNEHO MIESTA

Marianna Gregová Trenčanová¹, Dušan Velič^{1,2}

¹Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Mlynská dolina, 842 15, Bratislava, Slovenská Republika; 00421904015562, [trenchanova@fns.uniba.sk](mailto:trencanova@fns.uniba.sk)

²Medzinárodné laserové centrum, Ilkovičova 3, 84104 Bratislava, Slovenská Republika

Abstrakt

Supramolekulový komplex slúžil ako simulácia proteínového aktívneho miesta. Skúmali sa fluorescenčné vlastnosti supramolekulových komplexov kumarínu c153 a β -cyklodextrínu a jeho modifikácií 6-deoxy-6-monothio- β -cyklodextrínu a 6-deoxy-6-thio- β -cyklodextrínu vo vodnom roztoku pomocou statickej a časovo-rozlišenej fluorescenčnej spektroskopie. Pozorovali sme zmenu polarizácie v okolí fluoroforu a zmenu solvatačných podmienok, čo dokazujú fluorescenčné spektrá, časovo rozlíšené spektrá a Stokesov posun pre jednotlivé supramolekulové komplexy. S narastajúcim počtom SH-skupín v molekule cyklodextrínu dochádzalo ku poklesu Stokesovho posunu z hodnoty 5900 cm⁻¹ až o 1400 cm⁻¹ a relaxačného času τ_1 z hodnoty 0,13 ps – 0,9 ps pre spektrá do 5 ps od excitácie a v intervale 1,3- 2 ps pre spektrá do 50 ps. S narastajúcou koncentráciou cyklodextrínu a počtom modifikácií dochádzalo ku stabilizácii komplexu.

KLúčové slová: fluorescencia; supramolekulový komplex; β -cyklodextrín, kumarín c153

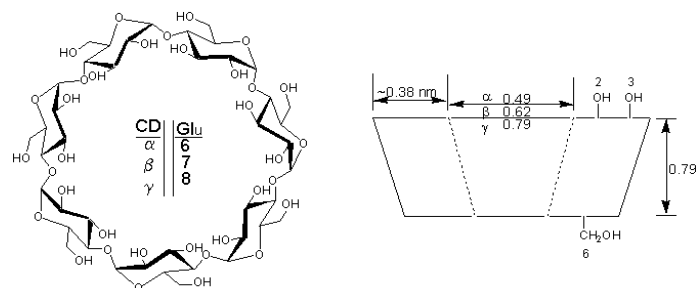
Úvod a formulácia cieľa

Voda je esenciálnou zložkou života a napriek jej dôležitosti nemôžeme povedať, že by sme na molekulárnej úrovni rozumeli každému jej vplyvu. Je známe, že má veľký vplyv na aktivitu skoro všetkých proteínov a nukleových kyselín, ktoré sú bez prítomnosti vody neaktívne [1-5]. Hydratácia taktiež ovplyvňuje ich štruktúrnu stabilitu, flexibilitu a funkčnosť. Z toho dôvodu je veľmi dôležité charakterizovať čo najpresnejšie interakciu voda-proteín. V roku 1960 Perutz a kolektív [6] potvrdili existenciu takzvanej „biologickej vody“ alebo aj „živej vody“. Ide o tie molekuly vody ktoré sa podieľajú na vytváraní už spomínanej interakcie. (Existuje viacero techník a prístupov, ktoré sa používajú na skúmanie „živej vody“ ako sú fluorescencia, časovo rozlíšená fluorescencia, NMR, dielektrická relaxácia, neutrónový rozptyl a mnohé ďalšie. V našej práci sme používali fluorescenčné techniky a to z dôvodu veľkej citlivosti fluorofóru na polaritu prostredia.

Pomocou supramolekulových komplexov β -cyklodextrín / kumarín c153 tiolované β -cyklodextríny / kumarín c153 sme simulovali aktívne miesto proteínu, kde kavita cyklodextrínu predstavovala aktívne miesto proteínu.

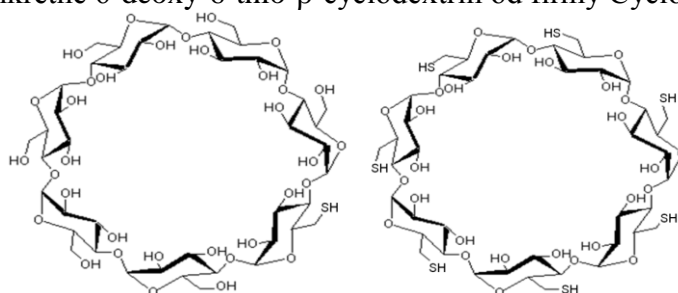
Materiál a metódy

Cyklodextríny sú cyklické oligosacharidy D-glukopiránózy spojenej α -1,4-glykozidovou väzbou. V súčasnosti je známych veľa typov cyklodextrínov líšiacich sa nielen počtom Glu jednotiek ale aj modifikáciou samotnej použitej glukopiránózy. Cyklodextríny majú tvar dutého zrezaného kužeľa, kde vonkajšie časti molekuly v dôsledku prítomnosti OH-skupín majú polárny charakter a vnútro kužeľa zas nepolárny, preto je cyklodextrín často využívaný ako prenášač nepolárnych látok v polárnom prostredí (Obr. 1) [7].



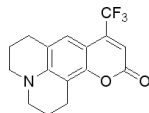
Obrázok 1. Štruktúrny vzorec β -cyklodextrínu a jeho geometrické rozmery.

V našej práci sme používali β -cyklodextrín od firmy Sigma-Aldrich a jeho tioderiváty: monotiolovalý β -cyklodextrín, konkrétne 6-deoxy-6-monothio- β -cyklodextrín a polytiolovalý β -cyklodextrín, konkrétne 6-deoxy-6-thio- β -cyklodextrín od firmy Cyclolab.



Obrázok 2. 6-deoxy-6-monothio- β -cyclodextrin (MTCBD) a heptakis 6-deoxy-6-thio- β -cyclodextrin (PTBCD)

Kumarín (Obr.3) je organické fluorescenčné farbivo. Fluorescenciu spôsobuje pevný skelet molekuly, prítomnosť konjugovaných násobných väzieb a teda prítomnosť delokalizovaných π -elektrónov nachádzajúcich sa v laktónovej a benzénovej štruktúre. V našom experimente sme použili kumarín c153. Jeho relatívna molekulová hmotnosť je 309,28 a sumárny vzorec je $C_{16}H_{14}F_3NO_2$ [8].

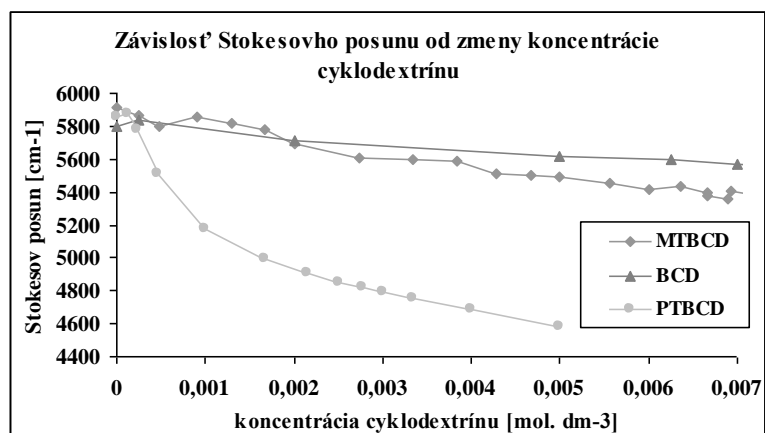


Obrázok 3. Štruktúra kumarínu c153

Tvorbu supramolekulového komplexu BCD/c153 vo vode a jeho SH-derivátov sme pozorovali pomocou statickej fluorescenčnej spektroskopie (Fluorológ Jobin Yvon Spec) a časovo-rozlíšenej fluorescenčnej spektroskopie. Použitím Titánzařirového oscilátora sme pripravili femtosekundové pulzy, ktorými sme následne v jednotke FOG (Fluorescence Optical Gating) excitovali vzorku. Detektor následne zaznamenával fotóny ktoré vznikli prekryvom fluorescenčného signálu zo signálom z oneskorovacieho zariadenia v BBO kryštály, pomocou súčtovej frekvencie

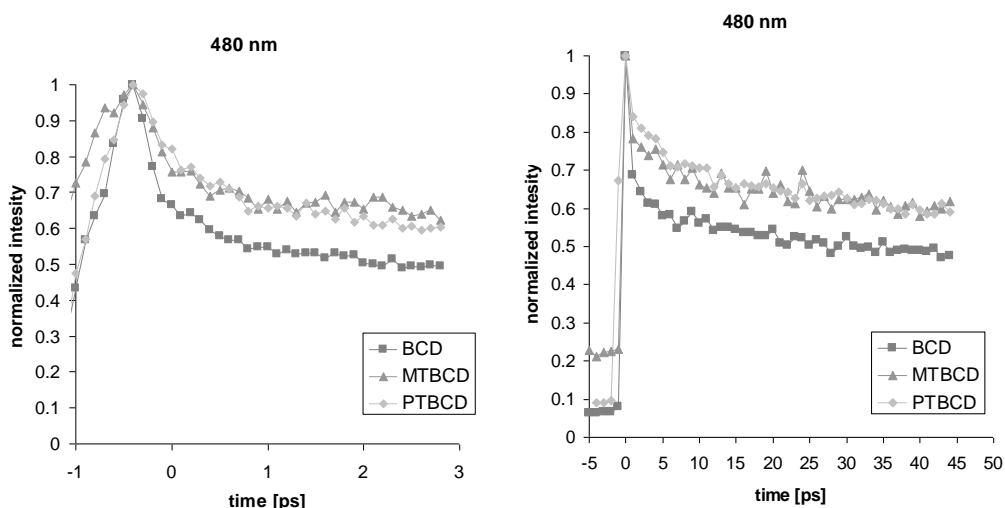
Výsledky a diskusia

Pomocou statickej fluorescenčnej spektroskopie sme získali excitačné a emisné spektrá daných supramolekulových komplexov pri konštantnej koncentracii kumarínu 10^{-5} M a koncentracii cyklodextrínov do $5 \cdot 10^{-3}$ M pre PTBCD a 10^{-2} M pre BCD a MTBCD. Pre tieto koncentračné rozsahy bol pozorovaný vznik komplexov v pomere 1:1 aj pre podobné cyklodextríny [9]. V emisných spektrách sme pozorovali posun k nižším vlnovým dĺžkam v závislosti od koncentrácie CD, čo sa prejavilo aj poklesom Stokesovho posunu (Obr.4), čo poukazuje na zmenu polaritu v okolí fluorofóru.



Obrázok 4.: Závislosť zmeny Stokesovho posunu od narastajúcej koncentrácie cyklodextrínu pre jednotlivé supramolekulové komplexy

Zaoberali sme sa dvomi časovými škálami do 5 ps a do 50 ps od excitácie (Obr.5). Dané časové škály boli zvolené tak aby zodpovedali pozorovaným časom pre relaxáciu „živej vody“ [10].



Obrázok 5. Časové závislosti relaxácie pre jednotlivé systémy pri vlnovej dĺžke 480 nm

Pre jednotlivé supramolekulové komplexy sme stanovili relaxačné časy τ_1 a τ_2 . (Tab.1) τ_1 vypovedá o relaxácii „živej vody“ a teda o správaní molekúl vody v blízkosti fluorofóru a τ_2 popisuje takzvanú „bulk water“ čiže molekuly vody vo väčšej vzdialenosti, ktoré sa nezúčastňujú na interakcií v takej veľkej miere. S narastajúcim počtom SH- skupín narastajú aj vypočítané časy.

Tabuľka 1. Relaxačné časy pre jednotlivé supramolekulové komplexy a časové intervaly

| 0-50 ps | c153 | c153/BCD | c153/MTBCD | c153/PTBCD |
|---------------|---------|----------|------------|------------|
| τ_1 [ps] | 1,882 | 1,288 | 1,636 | 1,976 |
| τ_2 [ps] | 138,344 | 184,851 | 217,364 | 222,922 |
| 0-5 ps | | | | |
| τ_1 [ps] | 6,892 | 0.131 | 0,4086 | 0,6111 |
| τ_2 [ps] | 48,412 | 23.393 | 26,973 | 27,440 |

Záver

Skúmali sa fluorescenčné vlastnosti inklúzy supramolekulových komplexov na báze kumarínu c153/ β -cyclodextrín a jeho modifikácie 6-deoxy-6-monothio- β -cyclodextrín a

6-deoxy-6-thio- β -cyclodextrín vo vodnom roztoku. Supramolekulový komplex, presnejšie nepolárna kavita cyklodextrínu slúžil ako simulácia proteínového aktívneho miesta. Pomocou statickej fluorescenčnej spektroskopie sme namerali excitačné a emisné spektrá, kde sme stanovili maximálnu vlnovú dĺžku excitácie 409 – 417 nm a fluorescencie 548 – 509 nm. Dochádzalo tiež ku poklesu Stokesovho posunu z hodnoty 5 900 cm^{-1} až o 1 400 cm^{-1} v závislosti od narastajúcej koncentrácie cyklodextrínu. Zistili sme, že prítomnosť a početnosť SH- skupiny stabilizuje supramolekulový komplex a spôsobuje dané posuny. Pomocou časovo-rozlišenej fluorescenčnej spektroskopie sme stanovili relaxačné časy τ_1 z hodnoty 0,13 ps – 0,9 ps pre spektrá do 5 ps od excitácie a v intervale 1,3- 2 ps pre spektrá do 50 ps. S narastajúcou koncentráciou cyklodextrínu a počtom modifikácií dochádzalo ku spomaľovaniu relaxácie kumarínu c153.

Pod'akovanie

Pod'akovanie patrí medzinárodnému laserovému centru za poskytnutie prístrojov a chemikálií a nasledovným grantom za finančnú podporu ERDF OP R&D, meta-QUTE – Centrum excelentnosti kvantových technológií, APVV-0491-07 a VEGA 1/0522/10, VEGA 1/0437/10

Zoznam použitej literatúry

- [1.] CHAPLIN, M. *Do we underestimate the importance of water in cell biology?*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2006, roč. 7, s. 861-866.
- [2.] PAL, S.K. ZEWAİL, A.H. *Dynamics of water in biological recognition*. Chem. Rev., 2004, roč. 139, č. 104, s. 2099-2124.
- [3.] LEVY, Y. *Water mediation in protein folding and molecular recognition*. Nann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 2006, roč. 14, č. 35 s. 389-415.
- [4.] FRAUENFELDER, H. *A unified model of protein dynamics*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, roč. 13, č. 106, s. 5129-5134.
- [5.] ZHONG, D. *Protein hydration dynamics and molecular mechanism of coupled water–protein fluctuations*. J. Am. Chem. Soc., 2009, roč. 30, č. 131, s. 10677-10691.
- [6.] PERUTZ, M.F. *Structure of Hæmoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å Resolution, Obtained by X-Ray Analysis*. Nature, 1960, roč. 87, č. 185, s. 416-422.
- [7.] DOUHAL. A. *Cyclodextrin Materials Photochemistry*, Photophysics and Photobiology. Elsevier, .2006, roč. 10. s. 1 – 24
- [8.] BODIS, P. *Fluorescence dynamics of coumarin C522 in water and in cyclodextrin cavity*. Femtochemistry and Femtobiology, 2004, roč. 7, s. 237 – 240
- [9.] ROY, D. BHATTACHARYYA, K. J. *Fluorescence anisotropy decay and solvation dynamics in a nanocavity: coumarin 153 in methyl β -cyclodextrin*. Phys. Chem. A, 2005, roč. 43, č. 109, s. 9716-9722.
- [10.] ZHONG ,D. ZEWAİL, A.H. *Biological water: A critique*. Chem. Phys. Lett., 2011, roč. 44, č. 503, s. 1-11.

Abstract

Supramolecular complex presented protein active site. Fluorescence behaviour was examined. Supramolecular complexes based on coumarine c153 and cyclodextrin derivates (6-deoxy-6-monothio)- β -cyclodextrin, 6-deoxy-6-thio- β -cyclodextrin in water were explored using the steady state and time resolved fluorescence. Change in polarity around the fluorophore were observed. Excitation and emission spectra were detected and Stokes shift was determined. With increasing the number of SH-groups in cyclodextrin the Stokes shift decrease from 5900 cm^{-1} to about 4500 cm^{-1} and the relaxation time τ_1 from 0.13 ps to 0.9 ps to 5 ps and from 1.3 to 2 ps to 50 ps spectra. With increasing the concentration and the number of the modifications occurred to the stabilization of the complex.