

PhD értekezés tézisei

Dipoláris relaxáció vizsgálata időbontott spektroszkópai módszerekkel

Buzády Andrea

Alprogram: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel
Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet

2002

Bevezetés

A fehérjék struktúrájának és dinamikájának vizsgálatokor széles körben alkalmazott módszer a fluoreszcencia spektroszkópia. Megfigyelhetjük akár a fehérjékben lévő saját fluoreszcenciával bíró aminosavak, akár a molekula kiszemelt részéhez kapcsolt festékmolekula – szonda, fluorofor – világítását. Míg a steady-state mérések segítségével a fluorofor körüli környezet struktúrájáról tudunk információt szerezni, az időbontott mérések révén ezen túlmenően, vizsgálhatjuk azon fotofizikai és fotokémiai folyamatok dinamikáját, amelyek hatással vannak a gerjesztett állapotú fluoroforra. Ezek például: az elektron- és proton-transzfer sztatikus és dinamikus kioltó hatása, gerjesztési energia átadása a fluorofor és más csoportok között, és az általunk tanulmányozott dipoláris relaxáció (DR). A DR időfüggésének meghatározásával a szonda környezetének dinamikájáról szerezhetünk értékes információkat.

A humán szérum albumin (HSA) a vérkeringésben fontos szerepet játszó transzport fehérje, fehérje-mátrixának dinamikai vizsgálata széleskörű érdeklődésre tart számot.

A fluoreszcencia átmenet élettartama (1–10 ns) alatt a nagy molekulákban, fehérjékben lejátszódó relaxációs folyamatok jól követhetők a fluoreszcencia emisszió időbontott megfigyelésével. A kísérletek során a 100 fs–10 ns időskálán vizsgáltuk a HSA fehérje-mátrixában a dipoláris relaxáció jelenségét.

A dolgozatban a lumineszcencia spektroszkópia kapcsolódó irodalmának áttekintését, majd a fogalmak, matematikai eszközök, mérési módszerek, a minta-előkészítés ismertetését követően a munkánk során kapott eredményekről, következtetésekről számolok be.

A PTE TTK Kísérleti Fizika Tanszék oktatója és a PTE ÁOK Biofizikai Intézet egyéni felkészülő PhD hallgatója vagyok, így az eredmények a két intézmény kooperációjában születtek. A kísérletek egy részét Pécsen, más részét Finnországban, Jyväskyläben végeztük.

Célkitűzés

Célul tűztük ki belső és külső kromofor fluoreszcenciájának megfigyelésével a HSA fehérje-mátrixa dipoláris relaxációjának nyomon követését és a relaxáció időfüggésének meghatározását a fehérje két, biokémiai folyamatok szempontjából fontos ligand-kötőhelyének közelében. Megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja a hőmérséklet és az oldószer összetétele a fehérje-mátrix dinamikáját a molekula belsejében és a felszín közelében. A fehérje dipoláris relaxációjában megjelenik egy gyors, ps-os mozgást jellemző komponens. Célunk volt ezen gyors mozgás eredetének a meghatározása az oldószerben oldott AC mintákon végzett mérésekkel.

Anyagok, módszerek

A HSA kb. 60 kD molekulasúlyú, globuláris szerkezetű fehérje. Három, strukturálisan homológ doménből áll, melyek mindegyike két kisebb doménre osztható. Két legfontosabb ligand-kötőhelye a IIA és a IIIA doménben van. Aminosavjai között egyetlen triptofán (Trp214) van a molekula belsejében, a IIA-ban, hidrofób zsebben. Anizotrópia mérésekből ismert, hogy szobahőmérsékleten a Trp rotációs szabadsága korlátozott, bár ez a hőmérséklet növekedésével csökken. Az egyetlen szabad SH csoportot tartalmazó cisztein (Cys34) a molekula felszínének közelében az IA doménben, hidrofób zsebben, az oldószer számára mégis hozzáférhetőbb helyen van. A cisztein maga nem világít, de SH csoportjához kovalens módon köthető fluorofor. Ez esetünkben az 6-acryloyl-2-dimethyl-aminonaphthalene (AC, acrylodan) volt, mely szelektív SH jelölő. Az AC nagy átmeneti dipólmomentummal rendelkezik és így igen érzékeny a környezet polaritásának változására. Molekulasúlya 225D.

A dipoláris relaxációt a fluoreszcencia időbeli megfigyelésével vizsgáltuk. Az időbontásos fluoreszcencia spektroszkópai módszerek közül elsőként a fázisfluorimetriát alkalmaztuk, amelynek segítségével a 0,1–10 ns közötti időtartományban lejátszódó folyamatok tanulmányozhatók. A méréseket ISS K2 és Jobin-Yvon Fluorolog Tau3 multifrekvenciás fázisfluorimétereken végeztük.

A szubpikoszekundumos időfelbontású pumpa-próba mérések esetén a pumpa impulzusok központi hullámhossza 395 nm, energiája 1,5 μJ /impulzus, a próba impulzusok hullámhossza 440-780 nm, időbeli szélessége 180–220 fs volt.

Eredmények

1. Fázisfluoriméterrel megmértük a HSA-ban a Trp fluoreszcencia lecsengését több emissziós hullámhosszon. Ezekből a lecsengési görbékből idő-emissziós mátrixot állítottunk össze. Az időbontott emissziós spektrumokból kiszámítottuk a spektrumok súlypontjának időfüggését, a $\nu(t)$ függvényt. A méréseket több különböző hőmérsékleten és kétféle oldószer (víz és víz/glicerin keverék) jelenlétében végeztük.

2. Megállapítottuk, hogy a HSA-ban levő Trp fluoreszcencia lecsengése nem monoexponenciális. Az emissziós spektrumok a megfigyelt idő tartományon (0,1–10 ns) a hosszabb hullámhosszak felé tolódnak.

3. Az emissziós spektrumok vörös-eltolódása dipoláris relaxációra utal. Annak eldöntéséhez, hogy ez a relaxáció a Trp körüli fehérje-mátrixhoz vagy az oldószer relaxációjához köthető, megmértük a NATA vizes oldatában a fluoreszcencia lecsengési görbéket több emissziós hullámhosszon. A lecsengési görbék nem különböztek egymástól, ami azt jelenti, hogy a NATA vizes oldatában a megfigyelt időtartományon nem észlelhető oldószer-relaxáció. A HSA-ban lévő Trp körüli relaxáció tehát egyértelműen a fehérje-mátrix dipoláris relaxációja.

4. A glicerin a fehérje konformációjára is hatással van, és nem csak a viszkozitást változtatja meg, hanem kis mértékben a dielektromos állandót és a pH-t is. 30%-nál nagyobb glicerin koncentráció esetén lecsökken a fluoreszcencia átlagélettartama. Glicerin jelenlétében megváltozik a fehérje hidratációja, a kémiai potenciál minimalizálása érdekében a HSA kompaktabb konformációt vesz fel. A fehérje-mátrix rigidebbé válik, tehát a relaxáció lassul, miközben a szomszédos csoportok kioltó hatása megnő, azaz a fluoreszcencia átlagélettartama csökken.

5. Meghatároztuk a DR időállandóit -4°C és 37°C között víz és víz/glicerin keverék jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a DR időállandója a hőmérséklettől és az oldószer összetételétől függ. Alacsonyabb hőmérsékleten, ill. glicerin jelenlétében a dipoláris relaxáció lassabb. A két különböző időállandójú DR-t – a rövidebb néhány száz ps, a hosszabb néhány ns – a HSA mátrixának különböző frekvenciájú rezgéseivel kapcsolhatjuk.

6. Megmértük a HSA/AC-ban az AC fluoreszcencia lecsengését több emissziós hullámhosszon. Ezekből idő-emissziós mátrixot állítottunk össze. Az időbontott emissziós

spektrumokból kiszámítottuk a spektrumok súlypontjának időfüggését, a $\nu(t)$ függvényt. A méréseket több különböző hőmérsékleten és kétféle oldószer (víz és víz/glicerin keverék) jelenlétében végeztük.

7. Az AC-al jelölt HSA fluoreszcencia lecsengése szintén nem monoexponenciális. A Cys34-hez kovalensen kapcsolt fluoreszcens szonda emissziójának tulajdonságai DR jelenlétére utalnak. A DR három időállandóval jellemezhető. A lassabb (0,1 ns, ill. néhány ns) komponensek a fehérje-mátrix relaxációjához köthetők, és annak különböző frekvenciájú mozgását tükrözik. A gyors (<10 ps) komponens feltehetően nem a fehérje-mátrix, hanem az oldószer relaxációjához tartozik.

8. Megvizsgáltuk tehát a HSA fehérje-mátrixának relaxációját a molekula két különböző részében. A Trp fluoreszcenciájának megfigyelésével (a Trp a molekula belsejében a IIA doménben, egy hidrofób zsebben van) a biokémiai kötések szempontjából fontos ligand-kötőhely körüli fehérje-mátrix relaxációjának időfüggését határoztuk meg. Az HSA/AC fluoreszcenciájának megfigyelésével (a Cys34 az IA doménben, a molekula felszínének közelében hidrofób zsebben található) a fehérje-mátrix olyan részének megfigyelése lehetséges, amely az oldószer számára jobban hozzáférhető. A fehérje-mátrix két részében a DR eltérő jellegű. Míg a molekula belsejében a hőmérséklet és az oldószer összetételének megváltozása nagymértékben befolyásolja a relaxáció sebességét, addig a felszín közelében – legalábbis a vizsgált hőmérséklet tartományban – lényegesen kevésbé függ a DR sebessége a hőmérséklettől és az oldószer összetételétől.

9. A fentebb említett 10 ps-nál rövidebb DR komponens meghatározása érdekében pumpa-próba méréseket végeztünk. Megmértük az oldószerben (DMF-ben és etanolban) oldott AC esetén a tranziens jel időfüggését több próba hullámhosszon. Az időbontott tranziens spektrumokban indukált emissziót és gerjesztett állapotú abszorpciót leíró színeképi sávokat határoztunk meg és követtük azok időbeli fejlődését.

10. A fluoreszcencia hullámhosszakon megjelenő indukált emissziós sávhoz tartozó tranziens spektrumokból meghatároztuk a DR-t jellemző időállandókat. DMF esetében három exponenciális összegével közelítettük a $\nu(t)$ függvényt, a legrövidebb 60 fs-os komponens véleményünk szerint a vibrációs relaxációt, a két ps-os komponens (1,5 ps ill. 7,8 ps) az oldószer-relaxációt jellemzi. Etanol esetében is három exponenciális összegével tudtuk a $\nu(t)$ függvényt közelíteni. A legrövidebb, 200 fs-os komponens a vibrációs relaxációhoz tartozik, a

3,8 ps-os komponens az oldószer-relaxációt jellemzi, a hosszabb 518 ps-os komponens megjelenése több egymással versenyző folyamat eredménye.

11. A mérések és számítások alapján modellt állítottunk fel a DMF-ben és etanolban oldott AC alap- és szinglett gerjesztett állapotainak energiaszintjeire. DMF-ben az AC fényabszorpciót követően az S_1 gerjesztett állapotba kerül, innen indukált emisszió ($S_1 \rightarrow S_0$) és kétféle gerjesztett állapotú abszorpció (nagyobb valószínűséggel $S_1 \rightarrow S_2$, kisebb valószínűséggel $S_1 \rightarrow S_3$) lehetséges. Az oldószer-relaxáció ps-os időtartományon következik be, ezt követően lecsökken az $S_1 \rightarrow S_0$ és a $S_1 \rightarrow S_2$, megnő az $S_1 \rightarrow S_3$ átmenet valószínűsége. Az első 15–20 ps után a rendszer S_1 állapotban egyensúlyba kerül és energetikai állapota hosszabb (350 ps) idő múlva is változatlan. Az egyensúlyi állapotból spontán emisszióra kerül sor. Etanolban a modell bonyolultabb. Az abszorpció után itt is megfigyelhetjük, hogy az oldószer-relaxációt követően lecsökken az indukált emisszió és a vörös gerjesztett állapotú abszorpció átmeneti valószínűsége, miközben a kék abszorpció megerősödik. A ps-os oldószer-relaxáció után azonban a molekula átalakul, izomerizáció következik be. Az új állapothoz más S_1 szint tartozik és innen újabb gerjesztett állapotú abszorpció és spontán emisszió lehetséges.

12. Megmértük HSA/AC-ban a tranziens jel időfüggését több próba hullámhosszon. Az időbontott tranziens spektrumok mérésével indukált emissziót és gerjesztett állapotú abszorpciót leíró színképi sávokat határoztunk meg és követtük azok időbeli fejlődését.

13. A fluoreszcencia emisszió hullámhosszain megjelenő indukált emissziós sávhoz tartozó tranziens spektrumokból meghatároztuk a DR-t jellemző időállandót. A megfigyelt 200 fs–20 ps időtartományon az AC körüli környezet DR-ját jellemző komponens 3,0 ps. Az oldószeres mérésekkel összevetve mondhatjuk, hogy ez nem a fehérje-mátrix, hanem az oldószer relaxációját jellemzi és azonos a fázisfluoriméteres mérésekben talált 10 ps-nál gyorsabb komponenssel.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Folyóiratban:

A. Buzády, J. Erostyák, B. Somogyi:

Phase-fluorimetry study on dielectric relaxation of human serum albumin.

Biophys. Chem., 88 (2000) 153-163.

A. Buzády, J. Erostyák, B. Somogyi:

Phase-fluorimetry study on dielectric relaxation of acrylodan-labeled human serum albumin.

Biophys. Chem., 94/1-2 (2001) 75-85.

A. Buzády, J. Savolainen, J. Erostyák, P. Myllyperkiö, B. Somogyi and J. Korppi-Tommola:
Femtosecond transient absorption study of dynamics of acrylodan in solution and attached to human serum albumin

J. Phys. Chem. B, (2002) közlésre elküldve

Konferencia előadások és poszterek

Buzády A., Erostyák J., Somogyi B., Kozma L.:

Szub-ns-os dipól relaxáció fehérjék oldataiban.

XXI. OLSK, Pécs, Hungary, 6-8 Oct. (1998)

Erostyák J., Buzády A.:

Pikoszekundumos fluoreszcencia spektroszkópia.

Fény-anyag kölcsönhatás, kvantumoptika. Tavaszi Iskola. Pécs, (1999) április 6-9., pp.109-117.

J. Erostyák, A. Buzády, B. Somogyi:

Limits and Artifacts of fitting of dipolar relaxation's parameters using series of exponentials.

6th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy.

Paris, France. (1999), P28.

A. Buzády, J. Erostyák, B. Somogyi:

Dielectric relaxation of human serum albumin in aqueous and viscous solutions.

6th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy.

Paris, France. (1999), P151.

Buzády A., Erostyák J., Somogyi B:

Humán szérum albumin dipoláris relaxációja vizes és glicerines oldatokban.

XXII. OLSK, Pécs, Hungary, 19-21 Oct. (1999).

J. Erostyák, A. Buzády, B. Somogyi:

Time-resolved spectroscopy measurements by phase-fluorometer.

5th Symposium on Instrumental Analysis. Pécs, Hungary, 24-27 Oct. (1999).

Az értekezés témájához nem kapcsolódó egyéb közlemények

Folyóiratban:

J. Erostyák, A. Buzády, I. Hornyák, L. Kozma:
Sensitized luminescence of $\text{Eu}^{3+}/\text{La}^{3+}$ /cinnamic acid mixed complex. Comparison to $\text{Eu}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$ /cinnamic acid mixed complex.
J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 121 (1999) p. 43-48.

J. Erostyák, A. Buzády, I. Hornyák, L. Kozma:
Sensitized luminescence of $\text{Eu}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$ /cinnamic acid mixed complex.
J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 115 (1998) p. 21-26.

M. Koós, I. Pócsik, J. Erostyák, A. Buzády:
Amorphous Carbon Luminescence; Excitation and Emission in a Broad Energy Range.
Journal of Non-Crystalline Solids., Vol.: 227-230, pp.: 579-582 (1998).

I. Hornyák, J. Erostyák, A. Buzády, A. Kaszás, L. Kozma:
Enhanced fluorimetric determination of samarium with dibenzoylmethane and diphenylguanidine by gadolinium.
Spec. Lett., 30(7), 1475-1783 (1997).

J. Erostyák, A. Buzády, A. Kaszás, L. Kozma, I. Hornyák:
Time-Resolved Study of Intramolecular Energy Transfer in Eu^{3+} , Tb^{3+}/β -diketone/o-Phen⁻anthroline Complexes in Aqueous Micellar Solutions.
Proceedings of the International Conference on Luminescence and Optical Spectroscopy of Condensed Matter, Prague, Czech Republik, 18-23 aug. (1996).
J. of Lumin., 72-74, (1997) pp. 570-571.

J. Erostyák, A. Buzády, L. Kozma, I. Hornyák:
Time-resolved luminescence of $\text{Eu(III)}/\text{Thenoyltrifluoroacetone}/\text{Surfactant}$ systems in aqueous solutions.
Spec. Lett., 28(3) (1995) pp.473-487

Konferencia előadások és posztterek

A. S. Ndao, J. Erostyák, A. Buzády, I. Hornyák, L. Kozma:
Luminescence properties of Eu^{3+}/QA and $\text{Eu}^{3+}/\text{DOQCA}$ complexes.
International Workshop on Spectroscopy and Applications. Dakar, Senegal. 14-18 Dec. (1998).

J. Erostyák, A. Buzády, I. Hornyák, L. Kozma:
Intra-, and intermolecular energy transfer processes in $\text{Eu}^{3+}/\text{La}^{3+}/\text{Cinnamic acid}$ complexes.
The Jablonski Centennial Conference. P97, p. 180., Torun, Poland, July 23-27 (1998).

J. Erostyák, A. Buzády, L. Kozma:
Intramolekuláris energia-átadás hatásfokának meghatározása termális lencse módszerrel.
3rd Symposium on Results of Hungarian Researches in Quantumelectronics, Budapest, Hungary, Oct. 30., (1997). P-51.

J. Erostyák, A. Buzády, I. Hornyák, L. Kozma, A. Kaszás:
Eu³⁺/Fahéjsav komplex lumineszcencia tulajdonságai por mintában.
XX. OLSI, Pécs, Hungary, 1-3 Oct. (1997). p. 219-223.

A. Buzády, L. Kozma, A. Kaszás, I. Hornyák, J. Erostyák:
Research of new analytical possibilities with time-resolved luminescence spectroscopy
methods.
5th Symposium on Analytical Sciences, Nice, France, 2-4 June (1997), p. 47.

I. Hornyák, J. Erostyák, L. Kozma, A. Buzády, A. Kaszás:
Enhanced fluorimetric determination of samarium with dibenzoylmethane and
diphenylguanidine by gadolinium.
4th Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Austria, 20-23 May (1997), L8.

Erostyák J., Buzády A., Kaszás A., L. Kozma, I. Hornyák:
Az o-fenantrolin szerepe az Eu/TTA/o-fenantrolin komplexben lejátszódó energiaátadásban.
XIX. OLSI, Pécs, Hungary, 1-3 Oct. (1996).

Erostyák J., Buzády A., Kaszás A., Kozma L., Hornyák I.:
Európium(III)/TTA/Phenantrolin komplexek vizes micelláris oldataiban lejátszódó
energiaátadási folyamatok időbontásos lumineszcencia vizsgálata.
XVIII. OLSI, Pécs, Hungary, 5-7 Oct. (1995). p. 75-80.

J. Erostyák, A. Buzády, L. Kozma, I. Hornyák, A. Kaszás:
Luminescence of Eu(III)/TTA/Surfactant systems.
XVII. OLSI, Pécs, Hungary, 4-6 Oct. (1994).

J. Erostyák, A. Buzády, L. Kozma, I. Hornyák:
Time-resolved luminescence of Eu(III)/Thenoyltrifluoroacetone complex in aqueous micellar
solutions.
2nd Symposium on Results of Hungarian Researches in Quantumelectronics, Budapest,
Hungary, Oct. 19., (1994), P43.