Univerza v Ljubljani Fakulteta za matematiko in fiziko

Fizika mehke snovi

Seminar

Samourejanje molekul gvanozina v vodnih raztopinah

Avtor: Klemen Kunstelj

Datum: 6.6.2006

Vsebina

VSEBINA	2
UVOD	3
UREJANJE GVANOZINOV V RAZTOPINAH	5
Dinamično sipanje svetlobe Eksperiment in rezultat Dinamičnega sipanja svetlobe	5 9
REZULTATI JEDRSKE MAGNETNE RESONANCE NA RAZTOPINAH NH_4 deoksi 5'-GMP Odvisnost od koncentracije in temperature	11
ZAKLJUČEK	14
LITERATURA	15

Uvod

Samourejanje oz. somopovezovanje bioloških molekul je pomembna lastnost marsikaterih procesov, tako na področju biologije kot tudi kemije makromolekul. Zelo nazoren primer je zmožnost samourejanja oz. samopovezovanja molekul gvanozina (Slika 1 (a)) preko vodikovih vezi v večje strukture t.i. G-kvartete (Slika 1 (b)). Gvanozin je molekula, ki je sestavljena iz več podenot:

- molekula gvanina (to je ena izmed nukleinskih baz, ki sestavljajo molekulo DNK).
- sladkor riboza
- fosfatna skupina.

Posebna lastnost molekule gvanozina, ki omogoča tvorbo teh G-kvartetov, je da vsebuje donorske in akceptorske skupine za tvorbo vodikove vezi. Poleg tega pa ima gvanozin tudi polarizabilno aromatsko površino z močnim molekulskim dipolnim momentom. Sicer pa je bila ta lastnost samourejanja gvanozina odkrita že pred več kot 40. leti, ko je skupina Gellerta poročala o slojastih tvorbah z vodikovimi vezmi povezanih gvanozin 5' (5'-GMP-prikazan na Slika 1 (a)) in gvanozin 3' monofosfatov (3'-GMP). Takrat je bilo tudi že znano, da G-kvarteti tvorijo vijačne strukture z razdaljo 3.25Å med sosednjimi enotami. V 70. in 80. letih prejšnjega stoletja je bilo doseženo pomembno odkritje in sicer, da se G-kvarteti v prisotnosti različnih alkalnih kationov samouredijo v večje strukture in sicer stabilne dolge 1D agregate, ki so bolj znani pod imenom G-žičke. Te strukture so zaradi kationov v raztopinah še bolj stabilne in predvsem daljše. Celoten proces samourejanja gvanozina je tako nazorno prikazan na Slika 1.



Slika 1: Shematski prikaz urejanja molekul Gvanozina (a) v G-kvartete (b) in G-žičke (c).

Samourejanje pa ni značilno le za molekulo gvanozina, ampak lahko to lastnost pripišemo tudi sami molekuli gvanina. Tako imajo npr. nekateri pajki celice imenovane

gvanociti, ki vsebujejo ploščaste strukture sestavljene iz gvanina. V primeru vzburjenja ali motnje iz okolice ti pajki s pomočjo teh gvanocitov spremenijo barvo. Poleg tega pa imajo tudi nekatere globokomorske ribe v očesih kristale iz gvanina, preko katerih svetlobo usmerjajo na fotoreceptorje.

Alkalijski kationi, ki so ponavadi prisotni v raztopinah gvanozinov, imajo nalogo večje stabilnosti G-žičk. Dokaz za to je prisotnost dveh ločenih vrhov v ¹H-NMR spektrih raztopin GMP-ja. Eden od njih pripada monomerom GMP molekul, drugi pa skupkom gvanozina. Ponavadi pride v raztopini do hitrega izmenjavanja med skupki in monomeri in bi zato v NMR spektrih videli le en vrh, kar pa se na primeru GMP-ja v vodi ne zgodi. To je dokaz, da so te strukture v vodi res kinetično in termodinamsko stabilne.

Nekatere študije so pokazale, da gvanozini (5'-GMP) v raztopinah tvorijo tudi tekočekristalne faze, kot so npr. od holesterna, nematska in heksagonalna tekočekristalna faza. To je možno zaradi gvanozinove lastnosti tvorbe nekovalentnih skupkov, v katerih so G-kvarteti podenote (Slika 1 (c)). To sta pokazali tudi študiji circularnega dikroizma in uklon rentgenskih žarkov na raztopinah gvanozina. Pri zelo visokih koncentracijah ti sistemi tvorijo heksagonalne tekočekristalne faze (Slika 2 c)). Odkritje te lastnosti gvanozinov je imelo pomembne posledice za kasnejši razvoj aplikativnih ved na področju materialov in nanotehnologije.



Slika 2: Različne tekočekristalne faze iz derivatov gvanozina; a) primer G-žičke oz. tvorba lateralnih skupkov iz G-kvartetov; b) Ureditev G-kvartetov v holesterno tekočekristalno fazo; c) heksagonalna tekočekristalna faza.

V zaključku uvoda je omembe vredno povedati še, da so bili G-kvarteti odkriti konec 80. let prejšnjega stoletja. Takrat je prevladovalo tudi mnenje, da se le-ti tvorijo pri asociaciji kromosomov v fazi mejoze (Sen in Gilbert). Tudi Sundquist in Klug sta bila prepričana, da so G-kvarteti pomembna sekundarna struktura, ki uravnavajo biokemične procese v telomernih področjih kromosomov. Od takrat dalje so bili in so še vedno zelo zanimivo raziskovalno področje v nanotehnologiji, biokemiji, biofiziki itd.

Urejanje gvanozinov v raztopinah

Gvanozin je edini od štirih DNK nukleotidov, ki se samoureja v zelo stabilne strukture, kot so npr. G-kvarteti ali kolumnarni skupki t.i. G-žičke. Dinamika in proces urejanja gvanozina v raztopinah sta tako odvisna od mnogih zunanjih dejavnikov, kot so npr. temperatura, pH raztopine, masna koncentracija (wt% kar predstavlja relativni delež mase gvanozina glede na celotno maso raztopine) in prav tako od vrste primešanih kationov. Slednji so vezani na gvanozin (na sliki 1 (a) so ti označeni z modro M⁺ in na sliki 1 (c) z modro kroglo) in imajo vlogo stabilizatorjev kolumnarnih skupkov. Ti so med seboj povežejo zaradi privlačnih π - π interakcij med aromatičnimi površinami. Stopnja nalaganja skupkov v te kolumnarne strukture je odvisna predvsem od vrste kationov v raztopini. Tako najbolj stabilne strukture tvori K⁺, temu sledijo NH4⁺ ter Na⁺ ioni, najmanj stabilne strukture pa dobimo, če se v raztopini nahajajo Rb⁺, Li⁺ in Cs⁺ kationi. Ta razdelitev je posledica omejenosti v prostoru med dvema sosednjima G-kvartetoma. Ta prostor služi kot vezavno mesto za kation, ki se s sosednjimi osmimi gvanozini poveže preko koordinativne vezi. Tudi dolžina teh kolumnarnih skupkov ali G-žičk je odvisna od temperature, koncentracije in pH raztopine.

Običajno se vzorci 5'-GMP ali deoksi gvanozin 5' monofosfata (deoksi 5'-GMP) preden ju raztopimo v vodi nahajata v obliki soli, in sicer v obliki natrijeve (Na₂ 5'-GMP), kalijeve (K 5'-GMP) oz. amonijeve (NH₄ 5'-GMP) soli. Tako je skupina Spindler et.al. proučevala agregacijo deoksi 5'-GMP vzorcev z dinamičnim sipanjem svetlobe in jedrsko magnetno resonanco, in sicer so opazovali kakšna je odvisnost med dolžino teh skupkov in različnimi zunanjimi dejavniki, največkrat so bile to koncentracija raztopine, tip kationov v raztopini in temperatura [2-7].

Dinamično sipanje svetlobe

Običajno je eksperiment dinamičnega sipanja svetlobe sestavljen iz naslednjih komponent (Slika 3):

- laser kot izvor svetlobe (npr. He-Ne laser z $\lambda = 632.8$ nm)
- polarizator in analizator
- nekaj optičnih elementov za usmerjanje laserske svetlobe in zbiranje sipane svetlobe
- goniometer oz. mehanizem za nastavitev sipalnega kota
- fotopomnoževalka (detektor sipane svetlobe)
- korelator



Slika 3: Shematski prikaz eksperimenta dinamičnega sipanja svetlobe (P-polarizator, L1-leča, A-analizator, L2-leča, F-optično vlakno).

Laserska svetloba iz He-Ne laserja je linearno polarizirana in je vektor polarizacije pravokoten na sipalno ravnino. Sipana oz. detektirana svetloba pa je potem linearno polarizirana v pravokotni smeri glede na sipalno ravnino (polarizirano sipanje) ali pa se vektor polarizacije nahaja v sipalni ravnini (depolarizirano sipanje). Prav tako je detektor montiran na posebno stojalo, s katerim je možno spreminjati sipalni kot θ , to je kot, pod katerim detektiramo sipano svetlobo in je določen glede na smer vpadne svetlobe. Zaradi šibkih intenzitet depolariziranega sipanja se pri tem načinu eksperiment dinamičnega sipanja izvaja le pri zelo majhnih sipalnih kotih (5°< θ <20°). Pri polariziranem sipanje pa problemov z nizkimi intezitetami ponavadi ni, zato je razpon sipalni kotov nekoliko večji, in sicer 30°< θ <90°.

Poglejmo si sedaj nekoliko bolj podrobno, kako lahko iz meritev dinamičnega sipanja svetlobe povemo nekaj o velikosti in obliki sipalnih delcev. Vpadno električno polje zapišemo v obliki ravnih valov:

$$\vec{E}(\vec{r},t) = \vec{n}E_0 \exp(i\vec{k}\cdot\vec{r} - i\omega t), \tag{1}$$

kjer \overline{n} predstavlja vektor polarizacije, E_0 amplitudo in ω frekvenco vpadnega polja. V snovi lahko lokalno dielektrično konstanto zapišemo s pomočjo tenzorja dielektričnih fluktuacij:

$$\underline{\underline{\mathcal{E}}}(\vec{r},t) = \underline{\mathcal{E}}'\underline{\underline{I}} + \underline{\underline{\delta}}\underline{\underline{\mathcal{E}}}(\vec{r},t), \tag{2}$$

kjer drugi člen predstavlja fluktuacijski del, \underline{I} pa je enotski tenzor drugega ranga. S pomočjo Maxwellskih enačb in upoštevanjem (1) in (2) lahko zapišemo sipano polje na razdalji r'. Pri tem upoštevamo tudi, da je ta razdalja precej večja od dimenzije sipalnega volumna:

$$E_{s}(r',t) = \frac{E_{0}}{4\pi r'\varepsilon_{0}} \exp(ik_{f}r') \int_{V} d^{3}r \exp(i\bar{q}\cdot\bar{r}-i\omega t) \left(\bar{n}_{f}\left(\bar{k}_{f}\times\left(\bar{k}_{f}\times\underline{\delta\varepsilon}(\bar{r},t)\cdot\bar{n}_{i}\right)\right)\right).$$
(3)

Enačbo (3) lahko poenostavimo, če $\underline{\delta \varepsilon}(\vec{r},t)$ transformiramo v Fourierov prostor ter to transformiranko poimenujemo struktrurni faktor $\underline{S}(\vec{q},t)$. Če v enačbi (3) odpravimo še vektorske produkte le-ta dobi bolj pregledno obliko:

$$E_{s}(r',t) = -\frac{k_{f}^{2}E_{0}}{4\pi r'\varepsilon_{0}}\exp(ik_{f}r'-i\omega t)S_{if}(\bar{q},t); \qquad S_{if} = \bar{n}_{f}\underline{\underline{S}}(\bar{q},t)\bar{n}_{i}.$$
(4)

Tako lahko pri izbranem vektorju \bar{q} na enostaven način izberemo, katero izmed Fourierovih komponent dielektričnih fluktuacij bomo merili. Ker pa imamo opravka z raztopino velikega števila delcev pa je potrebno celotni strukturni faktor zapisati kot vsoto strukturnih faktorjev posameznih delcev *j*. Najprej pa zapišimo strukturni faktor posameznega delca

$$S^{j}(\vec{q},t) = \int_{V} d^{3}\vec{r}' \underbrace{\underline{\delta \varepsilon}^{j}}_{(\vec{r}',t)} \exp(i\vec{q}\cdot\vec{r}_{j}(t) + i\vec{q}\cdot\vec{r}'(t)) = \underline{\underline{s}^{j}}_{(t)} \exp(i\vec{q}\cdot\vec{r}_{j}(t)), \tag{5}$$

pri čemer \vec{r}_j predstavlja krajevni vektor težišča, \vec{r}' pa predstavlja integracijo po volumnu delca. N atem mestu smo tudi uvedli strukturni tenzor j-tega delca $\underline{s}^j(t)$. Strukturni faktor raztopine delcev ima tako naslednjo obliko

$$S_{if}(\vec{q},t) = \sum_{j=1}^{N} s_{if}^{j}(t) \exp(i\vec{q}\cdot\vec{r}_{j}(t))$$
(6)

Ta strukturni factor lahko vstavimo v enačbo (4) za sipano polje in dobimo

$$E_{s}(\vec{q},t) = -\frac{k_{f}^{2}E_{0}}{4\pi r'\varepsilon_{0}}\exp(ik_{f}r'-i\omega t)\sum_{j=1}^{N}s_{if}^{j}(t)\exp(i\vec{q}\cdot\vec{r}_{j}(t)).$$
(7)

Ponavadi pri dinamičnem sipanju svetlobe merimo avtokorelacijsko funkcijo intenzitete svetlobe

$$G^{(2)}(\vec{q},t) = \left\langle I_{S}(\vec{q},0)I_{S}(\vec{q},t) \right\rangle = \lim_{T \to \infty} \frac{1}{T} \int_{0}^{T} dt' I_{S}(t')I_{S}(t+t').$$
(8)

To lahko zapišemo še v normalizirani obliki

$$g^{(2)}(\vec{q},t) = \frac{\left\langle I_{s}(\vec{q},0)I_{s}(\vec{q},t)\right\rangle}{\left\langle I_{s}^{2}(\vec{q})\right\rangle}.$$
(9)

Zelo podobno kot za intenzitetno avtokorelacojkos funkcijo veljajo za poljsko avtokorelacijsko funkcijo $G^{(1)}(\vec{q},t)$ in $g^{(1)}(\vec{q},t)$ podobne zveze. Na tem mestu bomo zato zapisali le relacijo med obema avtokorelacijskima funkcijama

$$g^{(2)}(\bar{q},t) = 1 + \alpha \left| g^{(1)}(\bar{q},t) \right|^2, \qquad (10)$$

kjer je parameter α prostorski koherenčni faktor, kateraga vrednosti so precej odvisne od same postavitve eksperimenta in ima zato tipične vrednosti med 0 in 1. največkrat ima kar vrednost 1.

Iz poljske korelacijske funkcije $G^{(1)}(\vec{q},t) = \langle E_s^*(\vec{q},t)E_s(\vec{q},t) \rangle$ lahko za redke raztopine določimo preprosto relacijo. Za take raztopine namreč velja, da se delci redko srečajo in je njihovo gibanje zato neodvisno

$$G^{(1)}(\vec{q},t) = \left|C\right|^2 \left\langle s_{if}(0)s_{if}(t)\right\rangle \left\langle \exp(i\vec{q}\cdot\Delta\vec{r}(t))\right\rangle,\tag{11}$$

kjer smo v konstanto C zapisali vse konstantne količine, ki nastopajo v (7). Pri tem smo upoštevali tudi, da imamo opravka z redkimi raztopinami, zato so mešani členi, ko seštevamo po parih delcev, v povprečju enaki 0.

Običajno so v raztopinah delci oz molekule, ki so dosti večji od samih molekul topila. Te molekule topila pa nenehno trkajo ob večje delce zato se le-te ves čas gibljejo po tekočini. To gibanje pa je naključno. Povprečni odmik $\langle \Delta \vec{r}(t) \rangle$ je enak 0, zato pa je $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ različen od 0. Verjetnost za premik $\Delta r^2(t)$ je porazdeljena Gaussovo, saj gre pri tem za naključno premikanje, porazdelitev po smereh pa je izotropna. Iz difuzijske enačbe lahko za delec izpeljemo naslednjo relacijo

$$\left\langle \Delta r^2(t) \right\rangle = 6Dt. \tag{12}$$

Prav tako lahko iz enačbe (11) dobimo za izotropno porazdeljene $\Delta r^2(t)$ naslednji izraz

$$\left\langle \exp(i\bar{q}\cdot\Delta\bar{r})\right\rangle = \exp\left(\frac{-q^2\left\langle\Delta r^2(t)\right\rangle}{6}\right) = \exp\left(-q^2Dt\right).$$
 (13)

Tako smo obliko delcev upoštevamo v difuzijski konstanti D, ki ima naslednjo obliko

• za delce okrogle oblike:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \tag{14}$$

 $(k_B \text{ je Boltzmannova kontanta}, \eta \text{ je viskoznost in } a \text{ polmer delca})$

• za delce paličaste oblike:

Translacijski difuzijski koeficent:
$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta L} (\ln p + \nu),$$
 (15)

Rotacijski difuzijski koeficent:
$$\theta_{\rm r} = \frac{3k_B T}{\pi \eta L^3} (\ln p + \delta),$$
 (16)

kjer je *p* razmerje med dolžino *L* in premerom *d*. Ta relacija velja le v primeru, ko je velja $2 . Na tem mestu je potrebno povedati še, da imata koeficienta <math>\delta$ in *v* naslednjo obliko: $v = 0.312+0.565/p+0.100/p^2$ in $\delta = -0.662+0.917/p-0.050/p^2$. Do teh vrednosti so prišli tako, da so za obliko cilindričnih delcev vzeli obliko prstana in nato numerično izračunali koeficiente. Teorija se imenuje Tirado Garcia de la Torre [8].

Eksperiment in rezultat Dinamičnega sipanja svetlobe

Sedaj si bomo nekoliko bolj podrobno pogledali študijo dinamičnega sipanja svetlobe in z njeno pomočjo proučevali samourejanje deoksi 5'-GMP v vodnih raztopinah [2]. Kot smo omenili že zgoraj se pri eksperimentu dinamičnega sipanja svetlobe meri normalizirano intenzitetno avtokorelacijsko funkcijo. Pri tem lahko poljsko avtokorelacijsko funkcijo za primer polidisperznosti v velikosti delcev izrazimo s pomočjo t.i. stretch eksponenta ali Kohlrausch Williams-Watts (KWW) funkcije

$$g_{1}(t) = \sum_{i} A_{i} \exp(-t / \tau_{i})^{\beta_{i}}$$
(17)

kjer A_i in τ_i predstavljata amplitudo in relaksacijski čas i-tega relaksacijskega načina. Povprečni relaksacijski čas lahko zapišemo s pomočjo parametra β_i , ki meri širino porazdelitve rleaksacijskih časov (zelo ozka porazdelitev sovpada z $\beta_i \sim 1$ in zelo široka z $\beta_i \sim 0$)

$$\langle \tau_i \rangle = \frac{\tau_i}{\beta_i} \Gamma(1/\beta_i),$$
 (18)

kjer $\Gamma(1/\beta_i)$ predstavlja gama funkcijo. Prav tako lahko za polarizirano sipanje določimo translacijski difuzijski koeficient s pomočjo naslednje relacije

$$D_i = \frac{1}{\langle \tau_i \rangle q^2}.$$
(19)

Tipičen signal dinamičnega sipanja za dve različni masni koncentraciji (6.25wt% in 10wt%) raztopin gvanozinov je predstavljen na sliki 4. Iz te lahko opazimo dva

karakteristična relaksacijska načina za raztopino gvanozinov. Eden pripada hitremu, drugi pa počasnemu relaksacijskemu načinu.



Slika 4: (a) Intenzitetna avtokorelacijska funkcija za raztopino NH₄ dGMP pri dveh masnih koncentracijah (6.25wt% in 10wt%). (b) Inverz relaksacijskega časa kot funkcija q^2 za oba relaksacijska načina. V tem primeru je bila masna koncentracija NH₄ dGMP enaka 4wt%.

Pri zelo razredčenih raztopinah tja do 4wt% iz rezultatov dinamičnega sipanja svetlobe na raztopinah NH₄dGMP opazimo le en počasni relaksacijski čas z difuzijskim koeficientom $11x10^{-13}$ m²/s. Ta pripada translacijskemu gibanju velikih globularnih skupkov s hidrodinamskim radijem okoli 200 nm. Da je ta relaksacijski način res posledica sipanja na večjih objektih, lepo prikazuje Slika 5. Na njej imamo prikazano odvisnost relativne amplitude A_{počasna}/(A_{počasna}+A_{hitra}) za tri različne masne koncentracije raztopin NH₄ deoksi 5'-GMP v odvisnosti od sipalnega vektorja *q*. Z naraščajočim sipalnim vektorjem lahko opazimo upadanje v relativni amplitudi počasnega relaksacijskega načina. Tako obnašanje pa je značilno za sipanje svetlobe na velikih objektih (*qr*_H>>1) in je povezano z efektom meddelčnih interferenc [9,10]. Prisotnost teh večjih globularnih skupkov je bila potrjena tudi z elektronsko mikroskopijo (Slika 5 (b)).



Slika 5: (a) Relativna amplituda počasnega relaksacijskega načina za NH_4 deoksi 5'-GMP za različne sipalne vektorje. (b) Prikaz globularnih struktur pod elektronskim mikroskopom.

Hitri relaksacijski način na Slika 4 (a) pripišemo translacijskemu gibanju cilindričnih skupkov NH₄ deoksi 5'-GMP. Ti se pričnejo tvoriti nad masno koncentracijo 4wt%, kar je moč potrditi z meritvami dinamičnega sipanja svetlobe, saj pod to kritično koncentracijo v avtokorelacijski funkciji tega ne opazimo. Rezultati meritev so pokazali, da je difuzijski koeficient D_{hitri} popolnoma neodvisen od sipalnega kota. To nakazuje na to, da imamo opravka z monodisperznimi sipalnimi objekti. Za redke raztopine (v tem primeru je bila to raztopina z masno koncentracijo 4wt%) lahko iz meritev avtokorelacijske funkcije določimo dimenzijo teh cilindričnih objektov po enačbi (15) in (16), iz katerih lahko tvorimo funkcijo za določitev dimenzij sipalnih delcev

$$f(p) = \frac{\left(9\pi\eta / k_B T\right)^{2/3} D}{\theta_{*}^{1/3}} = \frac{\ln p + \nu}{\left(\ln p + \delta\right)^{1/3}}$$
(20)

Viskoznostni koeficent 4wt% raztopine so določili s pomočjo rotacijskega viskozimetra in dobili naslednjo vrednost $\eta = 2.0\pm0.05$ mPa s. Iz meritev depolariziranega dinamičnega sipanja svetlobe na tej raztopini so dobili naslednje vrednosti:

- rotacijski difuzijski koeficient: $(42\pm4)\cdot10^3$ s⁻¹
- translacijski difuzijski koeficient: (151±4)·10⁻¹³ m²/s⁻¹.

S pomočjo teh difuzijskih koeficientov in enačbe (20) pa je za cilindrične delce možno določiti razmerje $p=14\pm3$, prečno dimenzijo d = 2.6 nm in povprečno dolžino 36.4 \pm 7.8 nm. Na tem mestu je potrebno omeniti, da zaradi meddelčnih interakcij vrednost L ni popolnoma točna, je pa njen red velikosti pravi.

*Rezultati jedrske magnetne resonance na raztopinah NH*₄ *deoksi 5'-GMP*

Tudi s pomočjo rezultatov jedrske magnetne resonance na jedrih ³¹P (³¹P NMR) [2] so pokazali, da je tvorba 1D agregatov gvanozina precej odvisna od masne koncentracije raztopine. Opravljene so bile meritve jedrske magnetne resonance za različne masne koncentracije raztopin NH₄ deoksi 5'-GMP. Na Slika 1 (a) imamo prikazan NMR spekter raztopin z 1wt%, 7.5wt% in 10wt% masno koncentracijo.



Slika 6: (a) ³¹P NMR spekter raztopin NH₄ deoksi 5'-GMP pri treh različnih masnih koncentracijah. (b) Relativna intenziteta za črto Δv_2 , ki pripada hitremu relaksacijskemu načinu.

Pri masnih koncentracijah pod 4wt% NMR spektrih opazimo en močan vrh, ki verjetno pripada velikim globularnim skupkom oz. počasnemu relaksacijskemu načinu, ki ga opazimo pri merivah dinamičnega sipanja svetlobe. Opazimo pa lahko tudi zelo šibak NMR signal, ki pa je karakterističen za cilindrične skupke gvanozinov. Intenziteta tega vrha začne močno naraščati pri koncentracijah večjih od kritične, to je nad 4wt%. Ko pa koncentracija doseže vrednost 15wt%, pa lahko v NMR spektrih opazimo zelo širok vrh, ki pa je posledica nastajanja holesterične tekočekristalne faze cilindričnih struktur gvanozina. Zametke te faze so v nekaterih primerih opazili že pri nižjih masnih koncentracijah, in sicer že pri12.5wt%.

Odvisnost od koncentracije in temperature

V raziskavi [4] so prav tako s pomočjo dinamičnega sipanja svetlobe proučevali obnašanje oz. agregacijo derivatov gvanozina v vodnih raztopinah. Naredili so primerjalno študijo med 5'-GMP in deoksi 5'-GMP, ki sta bila v obliki Na⁺ in NH₄⁺ soli. Opazovali so, kako masna koncentracija in temperatura vplivata na tvorbo agregatov gvanozina. Prišli so naslednjih spoznanj:

- difuzijski koeficient in hidrodinamski radij agregatov v raztopini kažeta v odvisnosti od koncentracije značilno polielektrolitsko obnašanje [11,12]. Hidrodinamski radij *R_h*, ki ga lahko določimo iz enačbe (14) (namesto simbola *a* uporabimo *R_h*), z naraščajočo koncentracijo upada, kar nazorno prikazuje tudi Slika 7. Z naraščajočim številom cilindričnih agregatov v raztopini se poveča njihovo translacijsko gibanje zaradi povečanja elektrostatskih interakcij.
- Iz vrednosti za hidrodinamski radij pri 4wt% deoksi-5'-GMP, ki znaša 157±3 Å lahko ocenimo povprečno dolžino agregatov v raztopini (L = 400 Å). To pomeni, da je v takem agregatu nanizanih 110 tetramerov (Slika 1 (c)).



Slika 7: Hidrodinamski radij za hitri relaksacijski način pri sobni temperaturi v odvisnosti od masne koncentracije raztopine. Prikazani sta odvisnosti tako za 5'-GMP, kot tudi za deoksi-5'-GMP.



Slika 8: Odvisnost hidrodinamskega radija od temperature za deoksi 5'-GMP in 5'-GMP merjena pri različnih masnih koncentracijah.

- Iz Slika 7 lahko opazimo, da je fazni diagram za 5'-GMP glede na deoksi 5'-GMP premaknjen k višjim koncentracijam. Tako se pri koncentracijah nad 10wt% agregati deoksi-5'-GMP pričnejo v raztopini urejati v holesterično fazo, do čimer se pri agregatih 5'-GMP to zgodi šele nad 25wt%. Poleg tega je pri 5'-GMP opaziti hitri difuzijski način šele pri koncentracijah nad 12wt%. Pri tej koncentraciji dobimo za *R_h* vrednost 12.3±0.2 Å. To ustreza 4 naloženim tetramerom (Slika 1 (c)). Vendar pa že pri 13wt% vrednost *R_h* naraste na 30.4±0.7 Å (pri tem dobimo za povprečno dolžino takih agregatov *L* = 120 Å). Pri nadaljnjem povečevanju koncentracije pa prav tako kot pri deoksi 5'-GMP opazimo upadanje hidrodinamskega radija, kar je verjetno spet posledica hitrejšega translacijskega gibanja agregatov v raztopini.
- Na Slika 8 imamo prikazano temperaturno odvisnost hidrodinamskega radija merjenega pri različnih koncentracijah deoksi 5'-GMP in 5'-GMP. Za primer deoksi 5'-GMP pri 5wt% in 7.5wt% opazimo naraščanje R_h, dokler hitri relaksacijski čas v DLS spektrih popolnoma ne izgine. To pomeni, da se število agregatov v raztopini z naraščajočo temperaturo ponovno zmanjšuje. Pri 5'-GMP pri 15wt% in 23wt% pa lahko opazujemo celotni proces razgradnje agregatov zaradi povišanja temperature. V raztopini tako na koncu ostanejo le razkrojeni GMP delci, katerih povprečno velikost je možno oceniti na 5.5±0.6 Å.

Zaključek

V tem seminarju smo si nekoliko bolj podrobno s pomočjo dinamičnega sipanja svetlobe in jedrske magnetne resonance pogledali dinamiko in obnašanje različnih derivatov gvanozina v vodnih raztopinah. Rezultati so pokazali, da je njihova spontana agregacija v vodi odvisna od mnogih dejavnikov, kot so npr. vrsta derivata gvanozina (deoksi5'-GMP ali 5'-GMP), temperature in masne koncentracije. Ugotovili smo, da obstaja neka mejna koncentracija t.i. kritična koncentracija, pod katero imamo v raztopini prisotne le posamezne monomere in tetramere molekul gvanozina. Nad to kritično koncentracijo (za deoksi 5'-GMP znaša ta okoli 4wt%, za 5'-GMP pa 12wt%) pa v raztopini pride do nalaganja tetramerov v 1D oz. cilindrične strukture, ki pri zelo visokih koncentracijah tvorijo tekočekristalne faze (pri deoksi 5'-GMP je ta mejna koncentracija 10 wt%, pri 5'-GMP pa 25wt%).

Tudi temperatura je zelo pomembni zunanji dejavnik za tvorbo agregatov gvanozina. Rezultati dinamičnega sipanja svetlobe so nam tako pokazali, da pride z naraščanjem temperature do razpada cilindričnih agregatov in tako v raztopini ostanejo le manjše tvorbe iz molekul gvanozina.

Že v uvodu je bilo omenjeno, da je gvanozin sestavljen tudi iz DNK baze gvanina, ki igra eno od ključnih vlog pri transportu naboja po molekuli DNK. Tako bi molekule gvanozina zaradi svoje lastnosti samopovezovanja v dolge 1D skupke in lastnosti prenosa naboja služile kot vez med biološkim (celica) in elektronskim (nano-vezje) delom. Z njihovo pomočjo bi tako lahko proučevali oz. spremljali različne procese v celicah živih bitij.

Literatura

[1] J.T. Davis, Angew. Chem. Int. Ed. 43, 668-698 (2004);

[2] L.Spindler, I. Drevensek Olenik, M.Copic, R. Romih, J. Cerar, J. Škerjanc, in P. Mariani, Eur. Phys. J. E, **7**, 95-102 (2002);

[3] L. Spindler, I. Drevenšek-Olenik, M. Čopič, J. Cerar, J. Škerjanc, P. Mariani, *Eur. Phys. J. E*, , 13, 27-33, (2004);

[4] L. Spindler, F. Federiconi, P. Mariani, I. Drevenšek-Olenik, M. Čopič, M. Tomšič, A. Jamnik, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 435, 1/[661]-12/[672], (2005);

[5] L.Spindler, I. Drevenšek-Olenik, M. Čopič, P. Mariani, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 409, 43-50, (2004);

[6] L.Spindler, I. Drevenšek-Olenik, M. Čopič, P. Mariani, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 395, [317]/147-[323]/153, (**2003**);

[7] L.Spindler, I. Drevenšek-Olenik, M. Čopič, P. Mariani, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 367, 565-572, (2001);

[8] M.M. Tirado, J. Garcia de la Torre, J. Chem. Phys. 71, 2581 (1979); 73, 1986 (1980);

[9] B.J. Berne, R. Pecora, Dynamic Light Scattering (Wiley, New York, 1976);

[10] K.S. Schmitz, An introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules (Academic Press, Orlando, 1984);

[11] M. Sedlak, Langmuir 15, 4045 (1999);

[12] H. Lui, L. Skibinska, J. Gaspinski, A. Patkowski, E.W. Fisher, R. Pecora, J. Chem. Phys. 109, 7556 (1997);