

PRACOWNIA BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku

„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”

Biofizyka molekularna

Porównanie zwijania białka zielonej fluorescencji EGFP ze stanu zdenaturowanego 6 M GdnHCl i kwaśnym buforem (PBdZ 32b)



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt *Fizyka wobec wyzwań XXI wieku* współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

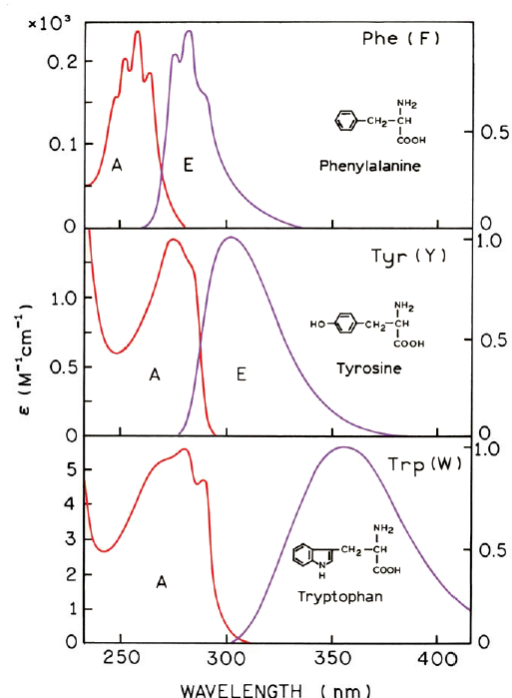
Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest obserwacja i porównanie procesu zwijania białka zielonej fluorescencji, a dokładnie mutantu o wzmocnionej fluorescencji EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein, F64L/S65T-GFP). Białko zostanie wcześniej zdenaturowane związkiem chaotropowym, jakim jest chlorowodorek guanidyny (GdnHCl), lub poprzez zakwaszenie roztworem buforu fosforanowego o pH 1. Zostanie przeprowadzony pomiar kinetyki zwijania przy użyciu techniki zatrzymanego przepływu w celu wyznaczenia i porównania między denaturantami charakterystycznych czasów reakcji. Czasowy przebieg zwijania w funkcji stężenia GdnHCl będzie przeprowadzony za pomocą spektrofluorymetru. Również dla czasów charakterystycznych dłuższych niż jest to możliwe dla techniki zatrzymanego przepływu, zostanie przeprowadzony pomiar za pomocą spektrofluorymetru.

Wstęp

Właściwości absorpcyjne i emisyjne aminokwasów i białek

Białka oraz peptydy składają się z 20 podstawowych aminokwasów, które poza rolą strukturalną mogą być również substratami utleniania komórkowego, neuroprzekaznikami czy hormonami. Jedynie 3 aminokwasy: fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan, przejawiają właściwości absorpcyjne i emisyjne w zakresie bliskiego nadfioletu (Rys. 1). Za właściwości te odpowiadają występujące w strukturze wymienionych aminokwasów pierścienie aromatyczne zawierające sprzężony układ π -elektronowy.



Rys. 1 Widma absorpcji (A) i emisji fluorescencji (E) aminokwasów aromatycznych w roztworze wodnym pH 7 oraz ich wzory strukturalne. Rysunek z J.R. Lakowicz, 2006.

Tabela 1. Właściwości spektralne aminokwasów aromatycznych w pH 7 (za G. D. Fasman 1976 i J. R. Lakowicz 2006)

	max. λ_A [nm]	max. λ_E [nm]	ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$]	Φ
Phe	257,5	282	15	0,03
Tyr	274	303	1 405	0,14
Trp	278	350	5 579	0,20

Szczególnie użytecznym aminokwasem do badania białek jest tryptofan. Ze wszystkich trzech aminokwasów aromatycznych ma on największą wydajność kwantową (Tabela 1), a długość fali emisji, jak i intensywność fluorescencji zależy od środowiska w jakim się znajduje. W związku z tym może on odzwierciedlać zachodzące w białku zmiany konformacyjne, denaturację, łączenie się podjednostek czy wiązanie substratu. Daje to także możliwości badania funkcji białek, ich zwijania oraz dynamiki. Ponadto ma on najdalej wysunięte pasmo absorpcji, dzięki czemu można wzbudzać go selektywnie, zazwyczaj w zakresie 295-305 nm. Ze względu na przekrywanie się widm absorpcji i emisji poszczególnych aminokwasów aromatycznych, może zachodzić między nimi przeniesienie

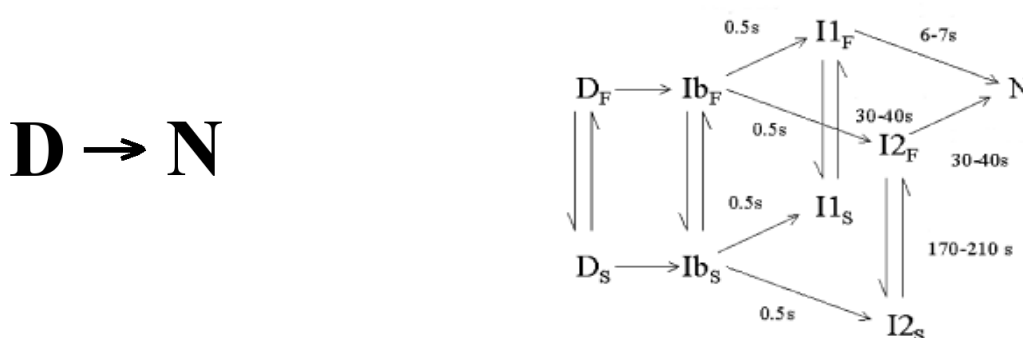
energii z fenyloalaniny na tyrozynę oraz z tyrozyny na tryptofan. Tryptofan jest także wrażliwy na wygaszanie fluorescencji, nie tylko przez cząsteczki roztworu, ale także we wnętrzu białka przez inne aminokwasy, np. lizynę lub histydynę, a także przez grupy amidowe wiązania peptydowego. Wszystkie te własności sprawiają, że decydujący wpływ na kształt widma absorpcji i emisji białka ma tryptofan, a maksimum absorpcji białka obserwuje się w 280 nm.

Zwijanie białek

Proces zwijania białek jest wciąż mało poznany i trudny do opisanego. Wiadomości na temat zwijania białek odnoszą się zazwyczaj do niewielkich białek globularnych lub pojedynczych globularnych domen białkowych. Przyjmowanie struktury natywnej przez łańcuch polipeptydowy najprawdopodobniej przebiega według zdefiniowanych ścieżek zwijania tworzących różne mechanizmy. Dwoma najbardziej skrajnymi zachowaniami w zwijaniu białek są modele: szkieletowy (lub ramowy) oraz kolapsu hydrofobowego. Model szkieletowy zakłada gwałtowne tworzenie lokalnej struktury II-rzędowej, która pełni funkcję rusztowania, po czym białko przyjmuje strukturę III-rzędową. W ramach modelu szkieletowego można wyróżnić mechanizmy:

- dyfuzyjno-zderzeniowy – najpierw tworzy się struktura II-rzędowa, która następnie poprzez dyfuzję i zderzenie się ze sobą tych struktur prowadzi do ich łączenia się i utworzenia struktury III-rzędowej
- nukleacji – jądro białka tworzy się wolno, lecz po jego utworzeniu następuje szybkie strukturyzowanie się właściwej konformacji.

Model kolapsu hydrofobowego zakłada, że w początkowym etapie zwijania następuje kolaps hydrofobowy, czyli gwałtowne tworzenie się hydrofobowego jądra (wyrzucane są z otoczenia molekule wody oraz m.in. aminokwasy polarne), a w następnej kolejności pojawia się struktura II-rzędowa. Zanim białko zwinie się prawidłowo, można zaobserwować stan nazywany strukturą stopionej globuli (ang. molten globule). Białko w tej postaci zawiera jądro hydrofobowe oraz strukturę II-rzędową w ułożeniu zbliżonym do natywnego. Jeśli występuje struktura III-rzędowa, to ma ona charakter dynamiczny. Aby białko mogło uzyskać stan natywny, musi nastąpić właściwe upakowanie i usztywnienie struktury. Realistyczne zachowanie podczas zwijania białek jest pośrednie pomiędzy opisanymi modelami.



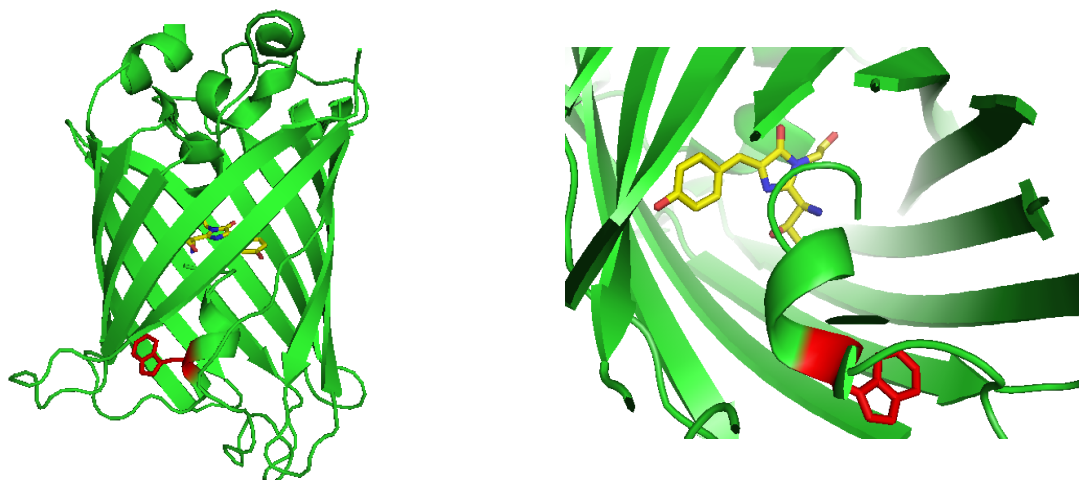
Rys. 2 Schemat zwijania jednoetapowego (panel lewy) i zwijanie wieloetapowe na przykładzie mutantu GFP – Cycle 3 (panel prawy, za Enoki et al. 2004); D – stan zdenaturowany, N – stan natywny, I_{X_Y} – intermedyaty różnego rodzaju

Zwijanie może być jedno- lub wieloetapowe. W zwijaniu jednoetapowym następuje bezpośrednio przejście od stanu zdenaturowanego (D) do stanu natywnego (N) (rys. 2, lewy panel), natomiast w zwijaniu wieloetapowym występują dodatkowo stany pośrednie, intermediaty (I), które wpływają na szybkość zwijania (Rys. 2, prawy panel). Prawdopodobnie intermediaty występują w każdym przypadku zwijania, jednak dla białek zwijających się jednoetapowo intermediaty te są nieuchwytnie w badaniach, dlatego że są nietrwałe, wysokoenergetyczne (występują w lokalnych minimach o wysokiej energii) i nie mają wpływu na szybkość zwijania.

Białko zielonej fluorescencji

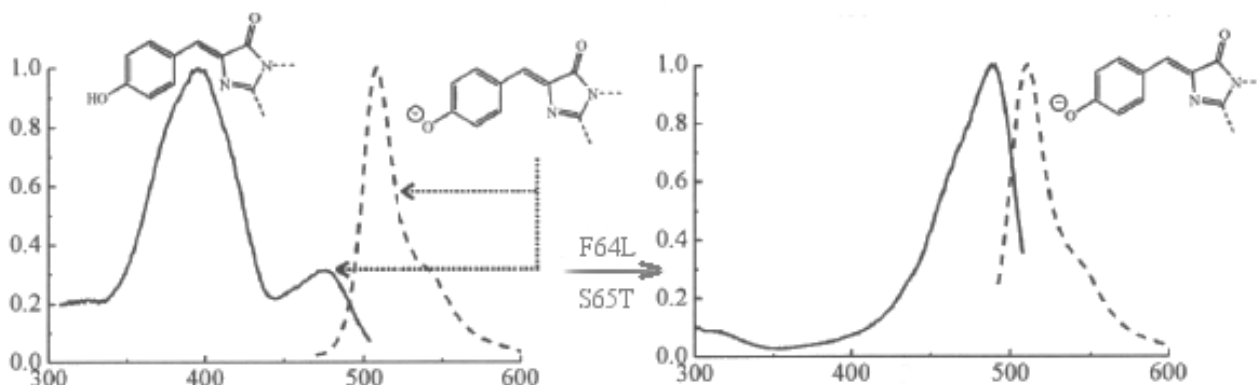
Białko zielonej fluorescencji (GFP – green fluorescent protein) zostało odkryte w latach 60-tych XX w. przez japońskiego naukowca Osamu Shimomura podczas badań nad białkiem akworyną. W 2008 r. Osamu Shimomura, Martin Chalfie oraz Roger Y. Tsien otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za odkrycie i rozwój metod pozwalających na zastosowania białka zielonej fluorescencji w biotechnologii. GFP naturalnie występuje w meduzie *Aequorea victoria* i tworzy z akworyną układ sprawiający, że zdenerwowana meduza zaczyna świecić. Akworyna, która ma związaną kolentrazynę (pigment występujący w pewnych jamochłonach), pod wpływem wiązania jonów wapnia utlenia kolentrazynę do wzbudzonej formy kolentramidu, który powracając do stanu podstawowego emituje światło o niebieskiej barwie. Emisja niebieskiego światła nie jest jednak widoczna, gdyż w układzie akworyna-GFP zachodzi rezonansowe przeniesienie energii (FRET), które powoduje wzbudzenie chromoforu białka zielonej fluorescencji i emisję o zielonej barwie.

Białko zielonej fluorescencji jest niedużym białkiem (ok. 27 kDa, 238 aminokwasów) o strukturze β -karkowej tworzącej beczkę przykrytą pętlami i helikalnymi fragmentami łańcucha polipeptydowego. W środku, wzdłuż osi beczki, biegnie α -helisa zawierająca chromofor (p-hydroksybenzylidienoimidazolinon), a u jej podstawy znajduje się jedyny w tym białku tryptofan (Rys. 3). Odległość między pierścieniami chromoforu i tryptofanu wynosi 11-15 Å, co umożliwia transfer energii z aminokwasu na chromofor. Ponadto w swojej strukturze EGFP zawiera także 11 tyrozyn i 12 fenyloalanin, 2 cysteiny nie tworzące ze sobą mostka disiarczkowego oraz 10 prolin, z czego tylko jedna znajduje się w konformacji *cis*.



Rys. 3 Struktura mutantu F64L/S65T-GFP (lewy panel, PDB 2Y0G) oraz wewnątrz β -beczki z chromoforem (żółty) i tryptofanem 57 (czerwony) (prawy panel).

W porównaniu z typem dzikim białka zielonej fluorescencji w EGFP wprowadzono leucynę w miejsce fenyloalaniny 64 i treoninę w miejsce seryny 65. Obie te mutacje okazały się mieć bardzo duże znaczenie dla wydajniejszego zwijania, wzmocnienia intensywności fluorescencji oraz uproszczenia widma absorpcyjnego białka (Rys. 4). Związane jest to między innymi ze zmianą stanu jonowego chromoforu, który w białku dzikim występuje zarówno w formie neutralnej (absorpcja w ok. 395 nm), jak i anionowej (absorpcja w ok. 475 nm), podczas gdy w EGFP praktycznie cała populacja białka ma chromofor w formie zjonizowanej. Maksyma absorpcji dla białka EGFP obserwuje się: dla aminokwasów aromatycznych w 278 nm oraz dla chromoforu w 489 nm. Doświadczalnie wyznaczone współczynniki ekstynkcji w pH 7,3 wynoszą odpowiednio $\epsilon_{277} = 21\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ oraz $\epsilon_{488} = 38\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Seifert et al., 2002). Maksyma emisji obserwuje się w 336 nm dla aminokwasów aromatycznych i w 509 nm dla chromoforu, co nadaje białku jaskrawe, zielono-żółte zabarwienie.



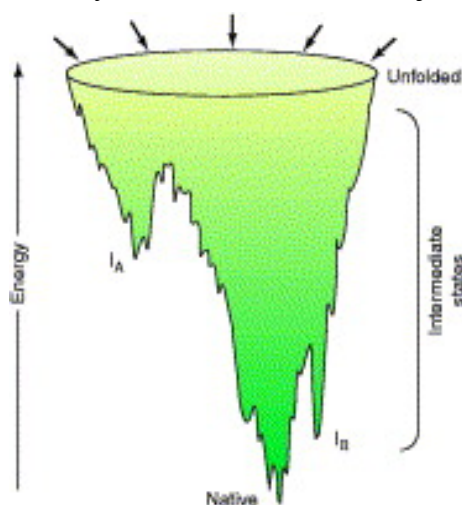
Rys. 4 Widmo wzbudzenia (ciągła linia) i emisji (przerywana linia) typu dzikiego wtGFP (lewy panel) oraz mutantu F64L/S65T-GFP (prawy panel). Rysunek za R. Y. Tsien 1998, str. 520.

Zwijanie białka zielonej fluorescencji

Odwracalna denaturacja białka może zostać osiągnięta m.in. przez użycie związku chaotropowego takiego jak mocznik czy chlorowodorek guanidyny (GdnHCl) lub też poprzez zakwaszanie środowiska. Denaturujące działanie GdnHCl opiera się na zaburzeniu oddziaływania białka ze środowiskiem ze względu na zakłócenie sieci wiązań wodorowych wody w roztworze. Z kolei zakwaszanie powoduje nagromadzenie ładunku dodatniego na powierzchni większości białek, co skutkuje wystąpieniem niekorzystnych dla molekuly oddziaływań elektrostatycznych, a także wpływa na wartości stałej asocjacji łańcuchów bocznych kwasu glutaminowego i asparaginowego. Renaturacja odbywa się poprzez powrót do warunków korzystnych dla białka, czyli poprzez rozcieńczenie czynnika chaotropowego lub neutralizację kwasu. Obecna wiedza dotycząca powtórnego zwijania GFP opiera się na eksperymentach i symulacjach prowadzonych na różnych mutantach tego białka, przede wszystkim na GFPuv (nazywane także Cycle3) oraz sfGFP (tzw. superfolder GFP). Duży wpływ na zwijanie ma obecność chromoforu, która sprawia, że tzw. pejzaż zwijania* staje się bardziej wyboisty (przykład Rys. 5). Oznacza to, że pojawiają się bariery

*Pejzaż zwijania jest to 3-wymiarowy sposób przedstawienia możliwych konformacji białka zależnie od energii i topologii łańcucha polipeptydowego; kształtem przypomina lejka, gdyż wraz z postępującym zwijaniem następuje redukcja dostępnych dla białka stanów; szeroka część lejka opisuje dostępne stany zdenaturowane, natomiast zwężenie jest globalnym minimum osiąganym przez stan natywny; lokalne minima energetyczne stanowią dodatkowe „doliny” lejka, natomiast bariery energetyczne są przedstawione jako „wypiętrzenia” pejzażu.

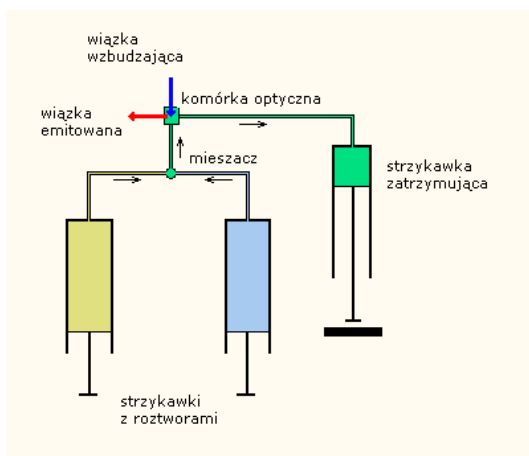
energetyczne oraz możliwość wystąpienia dodatkowych stanów pośrednich w porównaniu z tym samym białkiem, które chromoforu jeszcze nie posiada. Większość białek zwija się w czasie od milisekund do minut i w porównaniu z innymi niewielkimi białkami globularnymi GFP zwija się powoli. W zależności od stosowanego denaturanta obserwowane były kinetyki zwijania o różnej złożoności. Na przykład zwijanie białka ze stanu zdenaturowanego 8 M mocznikiem obserwowane poprzez fluorescencję chromoforu przebiegało dwuetapowo: $\tau_1 \approx 41$ s, $\tau_2 \approx 410$ s. Wówczas po raz pierwszy zaproponowano, że GFP prawdopodobnie zwija się według mechanizmu równoległych ścieżek zwijania. Wolniejsza i szybsza droga zwijania zależałyby wówczas od konformacji *cis* lub *trans* prolin białka w stanie rozwiniętym. Podobnie podczas zwijania białka zdenaturowanego 6 M GdnHCl przebieg był dwuetapowy, jednakże o czasach $\tau_1 = 263$ s i $\tau_2 = 1064$ s. Podczas badań nad równowagowym zwijaniem GFP w różnych stężeniach GdnCl zauważono występowanie stanu pośredniego o strukturze podobnej do natywnej, składający się w przewadze ze struktur II-rzędowych. Intermediat ten jest bardzo elastyczny, a białko bardzo szybko ze stanu



Rys. 5 Przykładowy pejzaż zwijania; u góry stan zdenaturowany, u dołu stan natywny, IA, IB - stany pośrednie (za P. L. Clark, 2004)

zdenaturowanego przyjmuje strukturę stanu pośredniego Z kolei przejście od stanu pośredniego do natywnego jest bardzo powolne. Badania nad kinetyką zwijania w funkcji pH wskazują na wieloetapowe zwijanie GFP. Potwierdza to wcześniejsze założenia, że zwijanie zależy od konformacji prolin białka w stanie zdenaturowanym. Zwijanie może następować szybką lub wolną ścieżką (Rys. 2, prawy panel). Faza kolapsu łańcucha polipeptydowego jest na tyle szybka, że nie jest rejestrowana przez dostępną aparaturę. Prawdopodobnie podczas tej fazy następuje upakowanie tryptofanu do hydrofobowego jądra białka. Następnie powstaje intermediat o zwartej strukturze, w którym tryptofan i chromofor są na tyle blisko siebie, że występuje między nimi transfer energii, co można zaobserwować w pomiarach fluorescencyjnych. W późniejszych badaniach stwierdzono, że

pośród różnych stanów pośrednich powstaje także intermediat o charakterze stopionej globuli, w którym z powodu braku właściwej struktury białka niemożliwa jest fluorescencja chromoforu. Na dzień dzisiejszy sugeruje się, że zwijanie GFP ma przynajmniej 6 faz, które stanowią układ równoległych ścieżek zwijania.



Rys. 6 Schemat aparatu zatrzymanego przepływu (za M. Narczyk, praca magisterska 2006)

Technika zatrzymanego przepływu

Schemat aparatu zatrzymanego przepływu (ang. stop-ped-flow) przedstawiony został na Rys. 6. W strzykawkach aparatu umieszcza się substancje pomiędzy którymi ma zajść reakcja i w zależności od rodzaju aparatu możliwe jest umieszczenie nawet 4 roztworów. Reakcję rozpoczyna się poprzez jednoczesne wypchnięcie za pomocą zewnętrznego tłoka cieczy ze strzykawek, które przez element mieszający trafiają do komórki optycznej. Mie-

szacz powoduje szybkie mieszanie składników i do kuwety trafia homogenny roztwór. Do cieczy o dużej różnicy gęstości często potrzebne są elementy mieszające specjalnie do tego przygotowane. Wraz z postępującym przepływem roztworów wyjściowych napełniana jest strzykawka zatrzymująca, której tłok blokuje się po uzyskaniu zadanej objętości, co jednocześnie zatrzymuje przepływ w całym aparacie. Zatrzymanie przepływu rozpoczyna rejestrację obserwowanego procesu. Wszystkie opisane wyżej czynności trwają zazwyczaj kilka milisekund i jest to tzw. czas martwy aparatu. Technikę zatrzymanego przepływu stosuje się w połączeniu z pomiarami absorpcyjnymi, emisyjnymi i dichroizmu kołowego.

Metody analizy danych

Do opisu kinetyki związania białka stosowano model wieloeksponencjalny [4,5,6,7]

$$I = \sum_i A_i \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) + A_{inf} \quad (1)$$

gdzie:

I – intensywność sygnału (sygnał absorpcyjny, emisyjny, dichroizmu kołowego)

A_i – amplituda i -tej fazy procesu

τ_i – czas charakterystyczny i -tej fazy procesu

A_{inf} – wyraz wolny

Bywa, że przydatna staje się modyfikacja wzoru (1) do postaci

$$I = \sum_i A_i \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) + a \cdot t + b \quad (2)$$

gdzie:

a – współczynnik kierunkowy prostej

b – wyraz wolny,

wówczas prosta opisuje fragment eksponencjalny, który nie został całkowicie zarejestrowany w trakcie pomiaru lub zjawisko fotowygazania (ang. photobleaching) fluoroforu.

Należy dopasować i wybrać najlepiej pasujący do uzyskanych danych model (tzn. sumę odpowiedniej liczby funkcji eksponens i ewentualnie zastosować proponowaną modyfikację), po uwzględnieniu uzyskanych parametrów dopasowań i ich niepewności oraz analizy odchyłań residualnych. Na podstawie otrzymanej liczby faz i czasów charakterystycznych można próbować dokonać interpretacji poszczególnych procesów występujących podczas związania białka.

Przebieg ćwiczenia

W pierwszej części ćwiczenia należy wykonać pomiary za pomocą techniki zatrzymanego przepływu. Proces związania będzie inicjowany poprzez zmieszanie w stosunku 1:10 zdenaturowanego białka w 50 mM buforze fosforanowym z 300 mM NaCl i 6 M GdnHCl z buforem o odpowied-

nio mniejszym stężeniu chlorowodoru guanidyny. Początkowe stężenie białka powinno wynosić 55 μM . Planowane końcowe stężenie GdnHCl powinno wynosić 1,5 M, 1M, 0,8 M, 0,5 M. Każdy bufor zwijający powinien zawierać β -merkaptobetanol – czynnik redukujący zapobiegający tworzeniu się mostków disiarczkowych. Końcowe stężenie β -merkaptobetanolu w kuwecie pomiarowej powinno wynosić ~ 14 mM. Stężenie przy którym chlorowodorek guanidyny nie powinien przeszkadzać białku w zwijaniu to 0,1 M. Kinytyki zwijania w stężeniach niższych niż 0,5 M GdnHCl zostaną zmierzone na spektrofлуorymetrze.

Pomiary na spektrofлуorymetrze w funkcji stężenia GdnHCl będą wyglądały podobnie, jak przy technice zatrzymanego przepływu, z tą różnicą, że bufor zwijający należy przygotować samodzielnie z buforów: bez GdnHCl oraz z 6M GdnHCl. Mieszanie składników będzie następowało bezpośrednio w kuwecie za pomocą mieszadła magnetycznego. Bufor zwijający powinien zawierać β -merkaptobetanol tak, aby jego końcowe stężenie wynosiło ~ 14 mM. Końcowe stężenie białka powinno wynosić ok. 2 μM . Końcowe stężenie chlorowodoru guanidyny, przy których będzie obserwowane zwijanie to 0,8 M, 0,6 M, 0,5 M, 0,3 M, 0,1 M oraz ~ 0 M.

Pomiary zwijania białka rozwiniętego przez zakwaszenie również będą przeprowadzone za pomocą techniki zatrzymanego przepływu oraz na spektrofлуorymetrze. Proces zwijania będzie inicjowany poprzez zmieszanie w proporcji 1:1 (lub 1:10) próbki białka zdenaturowanego w 100 mM roztworze buforu fosforanowego pH 1 z alkalizującym buforem zwijającym. Końcowe pH buforu powinno wynosić pH 8 – taki rodzaj eksperymentu z powodu naglej, a nie stopniowej, zmiany pH nazywany jest skokiem pH (z ang. pH-jump). Bufor zwijający powinien zawierać β -merkaptobetanol tak, aby jego końcowe stężenie wynosiło ~ 14 mM. O ile w przypadku pomiarów techniką zatrzymanego przepływu będzie można obserwować szybkie czasy zwijania, o tyle dłuższe fazy za pomocą spektrofлуorymetru. Poszukiwany jest czas, w którym przestaną zachodzić jakiegokolwiek zmiany badanego sygnału.

W każdym przypadku kinytyka będzie obserwowana dwutorowo: poprzez obserwację zmian fluorescencji tryptofanu $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 310$ nm oraz poprzez obserwację fluorescencji chromoforu $\lambda_{\text{ex}} = 489$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 509$ nm. Każdorazowo dobór szerokości szczelin oraz napięcia na fotopowielaczu należy do wykonujących ćwiczenie.

Analizując dane należy dopasować odpowiednią funkcję według wzoru (1) lub (2). Należy porównać ze sobą czasy charakterystyczne dla zwijania w funkcji chlorowodoru guanidyny mierzone techniką zatrzymanego przepływu oraz mierzone na spektrofлуorymetrze. Należy sprawdzić, czy wyniki między tymi dwiema technikami są spójne, czy też występuje między nimi różnica. Jeśli są różne, należy spróbować wyjaśnić dlaczego. Podobną analizę należy przeprowadzić dla pomiarów przy skoku pH. Na koniec należy porównać ze sobą czasy zwijania między zastosowanymi denaturantami:

- dla techniki zatrzymanego przepływu zwijanie wskutek skoku z pH 1 do pH 8 oraz przejścia ze stężenia 6 M GdnHCl do stężenia 0,5 M
- dla pomiarów na spektrofлуorymetrze zwijanie wskutek skoku z pH 1 do pH 8 oraz przejścia ze stężenia 6 M GdnHCl do stężenia ~ 0 M

Raport z wykonanego ćwiczenia

Opis powinien zawierać *Wstęp* z teoretycznym opisem badanego zagadnienia, *Materiały i metody*, z których student korzystał w czasie doświadczenia, także w tej części można zawrzeć opis przebiegu doświadczenia lub wyodrębnić go w osobnym akapicie. Następnie opis powinien zawierać *Wyniki i dyskusję* z prezentacją danych ich analizą i interpretacją. Należy pamiętać o podawaniu odpowiednio zaokrąglonego wyniku liczbowego wraz z niepewnością oraz o umieszczeniu na końcu opisu *Bibliografii*, a także załączników, jeśli student uzna to za konieczne.

Kolokwium wstępne

Warunkiem przystąpienia do części eksperymentalnej jest zaliczenie kolokwium wstępnego. Wybór sposobu przeprowadzenia kolokwium wstępnego zależy od prowadzącego ćwiczenie. Materiał z zakresu spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej obowiązujący w czasie kolokwium wstępnego został przedstawiony w niniejszej instrukcji, podczas wykładów „Spektroskopia Molekularna”, „Biologia Molekularna” oraz podczas zajęć na „Pracowni podstaw biofizyki” i w umieszczonej na końcu instrukcji bibliografii. Można także posiłkować się następującymi podręcznikami:

- Zbigniew Kęcki *Podstawy spektroskopii molekularnej*
- Gordon M. Barrow *Wstęp do spektroskopii molekularnej*
- pod redakcją Wojciecha Zielińskiego i Andrzeja Rajcy *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*
- Alfons Kawski *Fotoluminescencja roztworów*
- John A. Baltrop, John D. Coyle *Fotochemia podstawy*
- Joseph R. Lakowicz *Principles of fluorescence spectroscopy*

Przed kolokwium wstępnym należy także zapoznać się z publikacjami:

- ✓ H. Fukuda, M. Arai, K. Kuwajima, *Folding of Green Fluorescent Protein and the Cycle 3 mutant*, *Biochemistry* 2000, 39, 12025-12032
- ✓ S. Enoki, K. Saeki, K. Maki, K. Kuwajima, *Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein*, *Biochemistry* 2004, 43, 14238-14248
- ✓ S. Enoki, K. Maki, T. Inobe, K. Takahashi, K. Kamagata, T. Oroguchi, H. Nakatani, K. Tomoyori, K. Kuwajima, *The equilibrium unfolding intermediate observed at pH 4 and its relationship with the kinetic folding intermediates in green fluorescent protein*, *Journal of Molecular Biology* 2006, 361, 969-982

które otrzymają Państwo od prowadzącego.



Należy posiadać wiedzę na temat następujących zagadnień:

- Podstawowe definicje związane z promieniowaniem elektromagnetycznym i pomiarami spektroskopowymi:
 - długość fali, częstość drgania, liczba falowa
 - intensywność promieniowania, gęstość promieniowania
 - molowy współczynnik absorpcji (ekstynkcji), integralny współczynnik absorpcji
 - stan podstawowy, stan wzbudzony, siła oscylatora
 - wydajność kwantowa emisji
- Pomiar emisji promieniowania elektromagnetycznego
 - schematyczne przedstawienie zasady pomiarów emisji
 - co rozumiemy pod pojęciem widmo emisji?
 - co rozumiemy pod pojęciem widmo wzbudzenia?
 - ilościowy opis emisji (wydajność kwantowa emisji, jak ja wyznaczyć?)
 - czynniki determinujące kształt i szerokość konturu pasma emisyjnego
 - efekt filtra wewnętrznego
- Stany elektronowe cząsteczek:
 - pojęcie orbitali molekularnych, co oznaczają symbole σ , σ^* , π , π^* , n
 - diagram stanów elektronowych (S_0 , S_1 , S_2 , ..., T_1 , T_2 , ...) diagram Jabłońskiego
 - możliwe przejścia absorpcyjne i względne położenie odpowiadających im pasm na skali częstości promieniowania elektromagnetycznego
 - procesy dezaktywacji stanów wzbudzonych, przejścia promieniste i bezpromieniste, charakterystyczne stałe czasowe omawianych procesów.
- Właściwości absorpcyjne i emisyjne aminokwasów i białek
 - które aminokwasy posiadają właściwości absorpcyjne i emisyjne? Dlaczego?
 - charakterystyka spektralna aminokwasów aromatycznych
 - szczególne własności tryptofanu
 - w jaki sposób można spektralnie badać białka?
- Zwijanie białek, modele procesu zwijania białek
- Białko zielonej fluorescencji (GFP)
 - budowa i działanie GFP
 - wpływ mutacji na F64L i S65T na GFP
 - własności spektralne EGFP
 - zwijanie białka GFP przy denaturacji kwaśnej i denaturantem chaotropowym

Bibliografia

- (1) O. Shimomura, *Structure of the chromophore of Aequorea Green Fluorescent Protein*, FEBS Letters 1979, 104 (2), 220-222
- (2) M. Chalfie, *Green Fluorescent Protein*, Photochemistry and Photobiology 1995, 62 (4), 651-656
- (3) I. Żak, *Chemia medyczna*, rozdział 13 „Aminokwasy i pochodne”, Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2001
- (4) B. G. Reid, G. C. Flynn, *Chromophore formation in Green Fluorescent Protein*, Biochemistry 1997, 36, 6786-6791
- (5) H. Fukuda, M. Arai, K. Kuwajima, *Folding of Green Fluorescent Protein and the Cycle 3*

- mutant*, Biochemistry 2000, 39, 12025-12032
- (6) S. Enoki, K. Saeki, K. Maki, K. Kuwajima, *Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein*, Biochemistry 2004, 43, 14238-14248
- (7) S. Enoki, K. Maki, T. Inobe, K. Takahashi, K. Kamagata, T. Oroguchi, H. Nakatani, K. Tomoyori, K. Kuwajima, *The equilibrium unfolding intermediate observed at pH 4 and its relationship with the kinetic folding intermediates in green fluorescent protein*, Journal of Molecular Biology 2006, 361, 969-982
- (8) J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, 2006
- (9) J-r. Huang, T. D. Craggs, J. Christodoulou, S. E. Jackson, *Stable intermediate states and high energy barriers in the unfolding of GFP*, J. Mol. Biol. 2007, 370, 356-371
- (10) T. D. Craggs, *Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation*, Chem. Soc. Rev. 2009, 38, 2865-2875
- (11) S-T. D. Hsu, G. Blaser, S.E. Jackson, *The folding, stability and conformational dynamics of β -barrel fluorescent proteins*, Chem. Soc. Rev. 2009, 38, 2951-2965
- (12) J. Krasowska, M. Olasek, A. Bzowska, P. L. Clark, B. Wielgus-Kutrowska, *The comparison of aggregation and folding of enhanced green fluorescent protein*, Spectroscopy 2010, 24, 343-348
- (13) J. S. Merkel, L. Regan, *Modulating, Protein Folding rates in vivo and in vitro by side-chain interactions between the parallel strands of green fluorescent protein*, J. Biol. Chem. 2000, 275, 29200-29206

Przygotowanie odczynników:

Białko

GdnHCl: Rozwinąć białko w buforze 50 mM fosforan, 300 mM NaCl, 6 M GdnHCl i inkubować w przez 10 min. w temp. 95 °C. Dla upewnienia się, że białko się rozwinęło, można dokonać pomiaru widma fluorescencyjnego $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm obserwacja 290-550 nm. Chromofor nie powinien świecić, a w zakresie UV powinny być widoczne w miarę rozdzielone pasma tyrozynowe ($\lambda_{\text{max}} = 307$ nm) i tryptofanowe ($\lambda_{\text{max}} \sim 340-350$ nm). Do wyznaczenia stężenia powinno dać się skorzystać ze współczynnika ekstynkcji $\epsilon_{280} = 21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

pH: Białko rozwija się poprzez rozcieńczenie zwiniętego białka w buforze 100 mM fosforan pH 1, a następnie dializuje się tę próbkę przez noc w buforze pH 1. W celu wyznaczenia stężenia białka korzysta się ze zmodyfikowanych przez mnożniki współczynników ekstynkcji: $\epsilon'_{280} = 21000/1,19 = 17647 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ oraz $\epsilon'_{380} = 38000/2,1 = 18095 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

W obu przypadkach być może trzeba będzie odwirować lub przefiltrować białko, żeby pozbyć się agregatów.

Bufory

Do pomiarów stopped-flow w funkcji stężenia GdnHCl zestaw po 50 ml buforów 50 mM fosforan, 300 mM NaCl oraz a) 0 M GdnHCl b) 0,3 M GdnHCl c) 0,5 M GdnHCl d) 1,05 M GdnHCl; wszystkie pH 8. Przed pomiarami należy odlać potrzebną na dany dzień objętość i dodać β -merkaptanoetanol 1 μl na 1 ml buforu. (rozcieńczyć 1000 x). Stężenie białka 55 μM .

Do pomiarów na spektrofotometryrze należy przygotować po 250 ml buforów 50 mM fosforan, 300 mM NaCl bez GdnHCl oraz z 6 M GdnHCl oraz białko o stężeniu $\sim 1,2$ mM (rozwinąć w stężeniu \sim kilkadziesiąt μM , a potem zatężyć)

Do pomiarów skoku pH należy przygotować bufor pH 1 (100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{HCl}$) oraz bufor zwijający w zależności od ustawień stopped-flow. Najprawdopodobniej bufor zwijający powinien po zmieszaniu w proporcji 1 część buforu pH 1 i 10 części buforu alkalizującego dać pH 8. Druga opcja to po zmieszaniu 1:1 buforu pH 1 i buforu alkalizującego powinien dawać pH 8. Bufor alkalizujący: 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaOH}$ – najlepiej przygotować go w następujący sposób zmieszać pół na pół 200 mM Na_2HPO_4 z odpowiednio zmieszaną 1 M NaOH z H_2O ; manipulując proporcjami NaOH i wody można bezpiecznie sterować końcowym pH mieszaniny nie zmieniając stężenia fosforanu. Studenci przenoszą te same warunki na spektrofotometryr, nie trzeba przygotowywać innych buforów. Przed pomiarami należy odlać potrzebną na dany dzień objętość buforu alkalizującego i dodać β -merkaptanoetanol 1 μl na 1 ml buforu. Stężenie białka zależy od używanych proporcji mieszania: gdy 1:10 – stężenie białka 55 μM , gdy 1:1 10 μM .