

# **PRACOWNIA BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH**

**Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku**

**„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”**

**Biofizyka molekularna**

## **Badanie powtórnego fałdowania białka zielonej fluorescencji (GFP) w funkcji pH przy zastosowaniu techniki zatrzymanego przepływu (PBdZ 33)**



**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

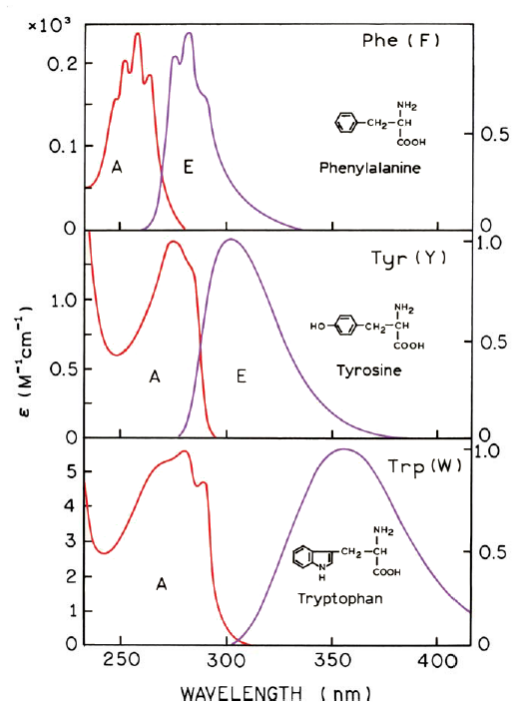
## Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z możliwościami techniki zatrzymanego przepływu (stopped-flow) w zastosowaniu do badania bardzo szybkich procesów kinetycznych na przykładzie powtórnego zwijania białka EGFP (enhanced Green Fluorescent Protein). Powtórne zwijanie białka należy przebadać w funkcji pH oraz określić każdorazowo liczbę etapów procesu, jak również czasy charakterystyczne opisujące te etapy.

## 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  $\pi$ -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.

emisji poszczególnych aminokwasów aromatycznych, może zachodzić między nimi przeniesienie energii z fenyloalaniny na tyrozinę 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.

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

	max. $\lambda_A$ [nm]	max. $\lambda_E$ [nm]	$\epsilon$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	$\Phi$
<b>Phe</b>	257,5	282	15	0,03
<b>Tyr</b>	274	303	1 405	0,14
<b>Trp</b>	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

## **Zwijanie białek**

Proces zwijania białek jest wciąż mało poznany i trudny do opisania. 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:

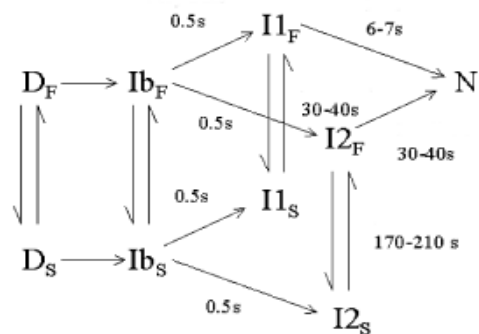
- dyfuzyjno-zderzeniowy – najpierw tworzy się struktura II-rzędowa, która następnie poprzez dyfuzję i zderzanie się ze sobą tych struktur prowadzi do ich łączenia się i utworzenia struktury III-rzędowej
- nukleacji – jądro białka tworzy się wolno, lecz po jego utworzeniu następuje szybkie strukturyzowanie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

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

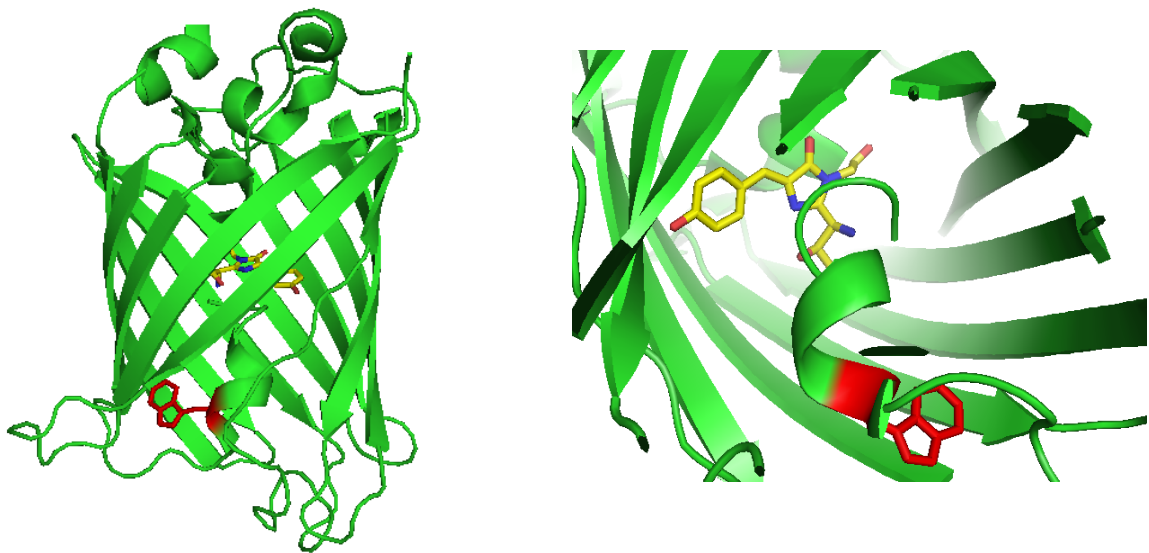


Rys. 2 Schemat zwijania jednoetapowego (panel lewy) i zwijanie wieloetapowe na przykładzie mutantu GFP – Cycle 3 (panel prawy, za Enoki et al. 2004); D – stan zdenaturowany, N – stan natywny, I<sub>X<sub>Y</sub></sub> – intermedyaty różnego rodzaju

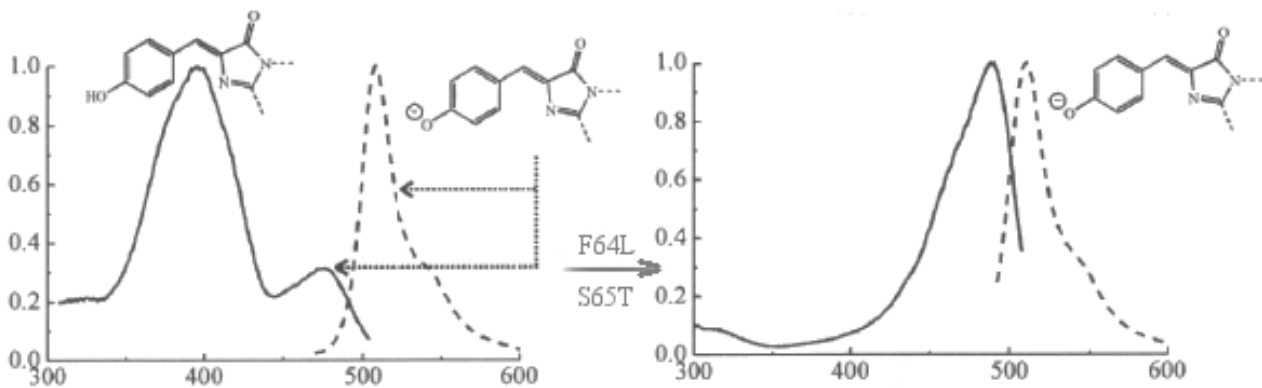
ma związaną kolentrazynę (pigment występujący w pewnych jamochłonach), pod wpływem wiązania jonów wapnia utlenia kolentrazynę do wzbudzonej formy kolentramidu, który powracając do stanu podstawowego emituje światło o niebieskiej barwie. Emisja niebieskiego światła nie jest jednak widoczna, gdyż w układzie 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-kartkowej 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 oraz 2 cysteiny nie tworzące ze sobą mostka disiarczkowego.

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. Maksima 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). Maksima emisji obserwuje się w 336 nm dla aminokwasów aromatycznych i w 509 nm dla chromoforu, co nadaje białku jaskrawe, zielono-żółte zabarwienie.



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

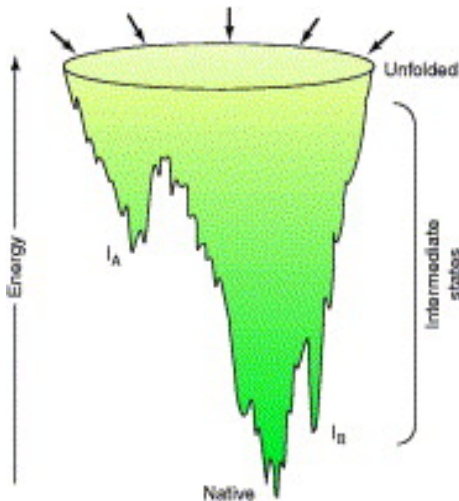


Rys. 4 Widmo wzbudzenia (ciągła linia) i emisji (przerywana linia) typu dzikiego wtGFP (lewy panel) oraz mutantna F64L/S65T-GFP (prawy panel). Rysunek za R. Y. Tsien 1998, str. 520.

### **Zwijanie białka zielonej fluorescencji**

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 energetyczne oraz możliwość wystąpienia dodatkowych stanów pośrednich w porównaniu z tym samym białkiem, które chromoforu jeszcze nie posiada. W porównaniu z innym niewielkimi białkami globularnymi GFP zwija się powoli. Podczas badań nad równowagowym zwijaniem GFP w różnych stężeniach chlorowodoru guanidyny (GdmHCl – substancja denaturująca) zauważono występowanie stanu pośredniego o strukturze podobnej do natywnej, składający się w przewadze ze struktur II-rzędowych. Intermediat

\* 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.

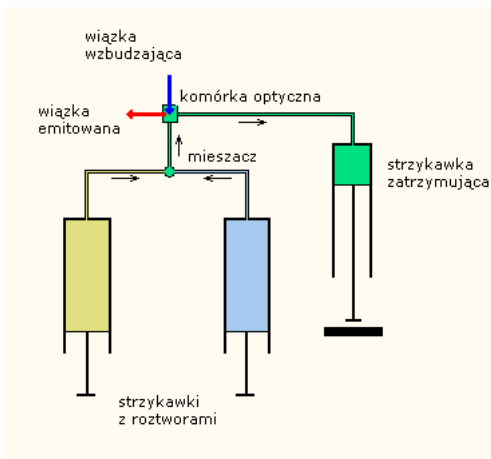


Rys. 5 Przykładowy pejzaż zwijania; u góry stan zdenaturowany, u dołu stan natywny, IA, IB - stany pośrednie (za P. L. Clark, 2004)

ten jest bardzo elastyczny, a białko bardzo szybko ze stanu 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. Jest to związane między innymi z występowaniem prolin, które w stanie rozwiniętym mogą występować w dowolnej konformacji *cis* lub *trans*, natomiast w stanie natywnym tylko jedna z dziesięciu znajduje się w konformacji *cis*. Zależnie od początkowego ustawienia prolin 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. Pośród różnych stanów pośrednich powstaje także intermediat o charakterze stopionej globuli, w którym z powodu braku właściwej struktury białka niemożliwa jest fluorescencja chromoforu. Sugeruje się, że zwijanie GFP ma przynajmniej 6 faz, które stanowią układ równoległych ścieżek zwijania.

### Technika zatrzymanego przepływu



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

Schemat aparatu zatrzymanego przepływu (ang. stopped-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 poprzez element mieszający trafiają do komórki optycznej. Mieszacz powoduje szybkie mieszanie składników i do kuwety trafia homogeny 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 analizy zwijania białka GFP jak i do procesu tworzenia chromoforu stosowano funkcję multieksponecjonalną, która jak do tej pory w sposób najlepszy opisywała obserwowane zjawiska (Reid and Flynn 1997, Enoki et al. 2004 i 2006, Zhang et al. 2008, Izuka et al. 2011)

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

gdzie:

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

$A_i$  – amplituda  $i$ -tej fazy procesu

$\tau_i$  – czas charakterystyczny  $i$ -tej fazy procesu

$A_{inf}$  – wyraz wolny

Wielokrotna analiza wykazała, że wzór ten można zmodyfikować poprzez dodanie prostej np. jeśli pomiar zostaje zakończony w środku trwania jednej z faz procesu lub występuje zjawisko fotowygazania (tzw. photobleaching)

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

gdzie:

$a$  – współczynnik kierunkowy prostej

$b$  – wyraz wolny

Należy dopasować i wybrać najlepiej pasujący do uzyskanych danych model, po uwzględnieniu uzyskanych parametrów dopasowań i ich niepewności oraz analizy odchyleń residualnych.

## **Przebieg ćwiczenia**

### Etap I

Studenci otrzymają:

- stężony roztwór białka EGFP w 50 mM buforze fosforanowym z 300 mM NaCl, pH 8 (stężenie poda prowadzący)
- 100 mM roztwór fosforanowy o pH 1
- 100 mM bufor fosforanowy pH 8

Za pomocą spektrofluorymetru należy wykonać widmo wzbudzenia i emisji białka EGFP w warunkach denaturujących (pH 1) i natywnych (pH 8). Na ich podstawie należy wybrać właściwe długości fali wzbudzenia i obserwacji fluorescencji dla pomiarów kinetycznych na aparacie zatrzymanego przepływu. Następnie studenci planują eksperyment na następnym dniu, ustalając jednocześnie jaką objętość białka o stężeniu 20  $\mu$ M należy przygotować. Białko należy rozcieńczyć w roztworze fosforanowym pH 1 i poddać dializie w błonie dializacyjnej.

### Etap 2

Studenci otrzymają:

- zestaw 100 mM buforów fosforanowych o różnym pH, które po zmieszaniu w proporcji 1:1 z buforem denaturującym pH 1 będą dawały końcowe pH w skali od pH 4 do 8
- $\beta$ -merkaptoetanol (14,3 M)

Studenci będą prowadzić eksperyment wstępny powtórnego zwijania białka przy zastosowaniu techniki zatrzymanego przepływu. Zwijanie będzie inicjowane przez skok pH. Przed rozpoczęciem zwijania białka do roztworów zwijających będzie należało dodać  $\beta$ -merkaptoetanol, który jest czynnikiem redukującym i zapobiega tworzeniu się mostków disiarczkowych. Stężenie  $\beta$ -merkaptoetanolu w roztworze zwijającym powinno wynosić ok. 28 mM. Korzystając z roztworu zdenaturowanego białka należy przeprowadzić pomiary wstępne kinetyki zwijania białka. Na ich podstawie należy właściwie dobrać czas pomiaru, szerokość szczelin dla wiązki światła wzbudzającego i wiązki emisyjnej oraz napięcie na fotopowielaczu aparatu zatrzymanego przepływu.

Na następny dzień pomiarowy należy przygotować białko i dokonać jego dializy.

### Etap 3

Studenci prowadzą właściwy eksperyment powtórnego zwijania EGFP w funkcji pH. Dla każdego pH należy przeprowadzić przynajmniej 10 powtórzeń pojedynczych eksperymentów zwijania białka. Należy także przeprowadzić pomiar tła dla zwijania, czyli pomiar mieszania się odpowiednich buforów. Zawsze należy przeprowadzić pomiar tła tego samego dnia, co pomiar zwijania, gdyż w ciągu doby następuje zmiana kształtu widma  $\beta$ -merkaptoetanolu. W związku z tym należy także pamiętać o przygotowaniu odpowiedniej ilości buforu zwijającego z  $\beta$ -merkaptoetanołem (ze względu na duże stężenie wyjściowe  $\beta$ -merkaptoetanolu, przygotowywanie każdej nowej porcji buforu może wiązać się ze zmianą jego stężenia końcowego).

### Etap 4

Studenci prowadzą analizę danych. Należy pamiętać odjęcia tła od danych dotyczących zwijania białka. W przypadku powtarzalnych pomiarów można je uśrednić, w przypadku danych niepowtarzalnych należy każdą krzywą analizować niezależnie. Może się również okazać, że nie będzie można dokonać analizy matematycznej niektórych danych. Wówczas należy dokonać próby interpretacji występującego zjawiska.

## **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 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:

- ✓ 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
  - budowa spektrofotometru i spektrofluorymetru
- 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?)
  - efekt filtra wewnętrznego

- Stany elektronowe cząsteczek:
  - pojęcie orbitali molekularnych, co oznaczają symbole  $\sigma$ ,  $\sigma^*$ ,  $\pi$ ,  $\pi^*$ , 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.
- Absorpcyjne i emisyjne widmo elektronowe ze strukturą oscylacyjną:
  - w jakim zakresie promieniowania obserwuje się absorpcyjne i emisyjne pasma elektronowe?
  - diagram Jabłońskiego
  - schemat przejść energetycznych dozwolonych przez reguły wyboru
  - przykładowy wygląd widma absorpcyjnego i widma emisyjnego ilustrujący prawidłowości wynikające ze struktury poziomów elektronowo-oscyłacyjnych i przejść między poziomami
- 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
  - zwijanie białka GFP
- Białko zielonej fluorescencji (GFP): budowa, działanie GFP, wpływ mutacji na GFP
- Technika zatrzymanego przepływu – zasada działania, zastosowanie

## 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. Źak, *Chemia medyczna*, rozdział 13 „Aminokwasy i pochodne”, Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2001
- (4) V. Dagget, A. Fersht, *The present view of the mechanism of protein folding*, Nature Reviews, Molecular Cell Biology 2003, 4, 497-502
- (5) S. Enoki, K. Saeki, K. Maki, K. Kuwajima, *Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein*, Biochemistry 2004, 43, 14238-14248
- (6) 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
- (7) J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, 2006

- (8) T. D. Craggs, *Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation*, Chem. Soc. Rev. 2009, 38, 2865-2875
- (9) A. Bzowska, *Skrypt do ćwiczenia „Spektroskopia absorpcyjna i emisyjna aminokwasów i białek, wykorzystanie w badaniach struktury i funkcji białek”*, Pracownia biofizyki dla zaawansowanych, Warszawa 2012