

PRACOWNIA BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku

„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”

Biofizyka molekularna

Absorpcyjne i emisyjne badanie tworzenia chromoforu białka zielonej fluorescencji EGFP (F64L/S65T-GFP) (PBdZ 35)



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



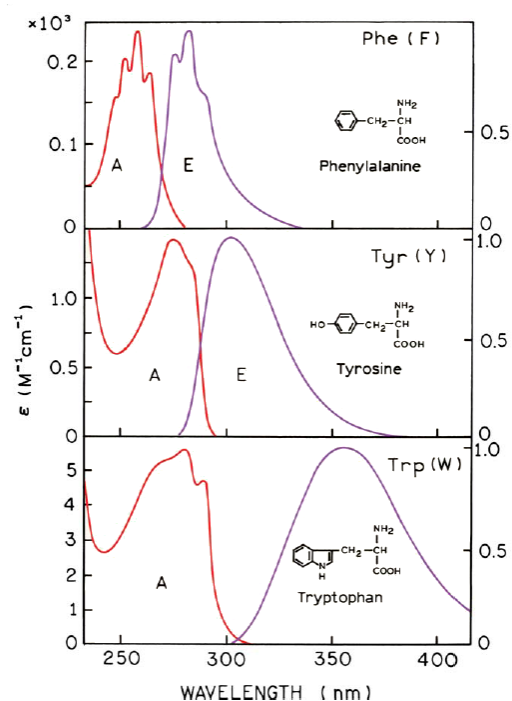
Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest porównanie kinetyki tworzenia się barwnego chromoforu w białku EGFP zarejestrowanej metodami absorpcyjną i emisyjną, a także wyznaczenie czasów charakterystycznych dla obserwowanego procesu.

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 tyrozyiny 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.

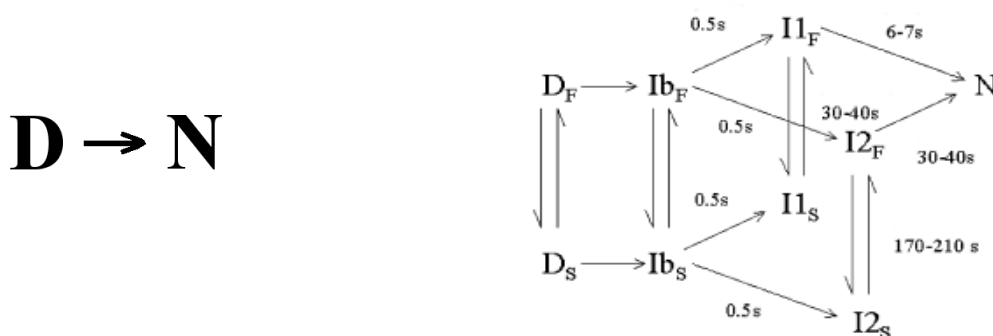
Zwijanie białek

Proces zwijania białek jest wciąż mało poznany i trudny do 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 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 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 bezpośrednie przejście od stanu zdenaturowanego (D) do stanu natywnego (N) (rys. 2, lewy panel), natomiast w zwijaniu wieloetapowym występują dodatkowo stany pośrednie, intermediały (I), które wpływają na szybkość zwijania (Rys. 2, prawy panel). Prawdopodobnie intermediały występują w każdym przypadku zwijania, jednak dla białek zwijających się jednoetapowo intermediały te są nieuchwytnie w badaniach, dlatego że są nietrwałe, wysokoenergetyczne (występują w lokalnych minimach o wysokiej energii) i nie mają wpływu na szybkość zwijania.

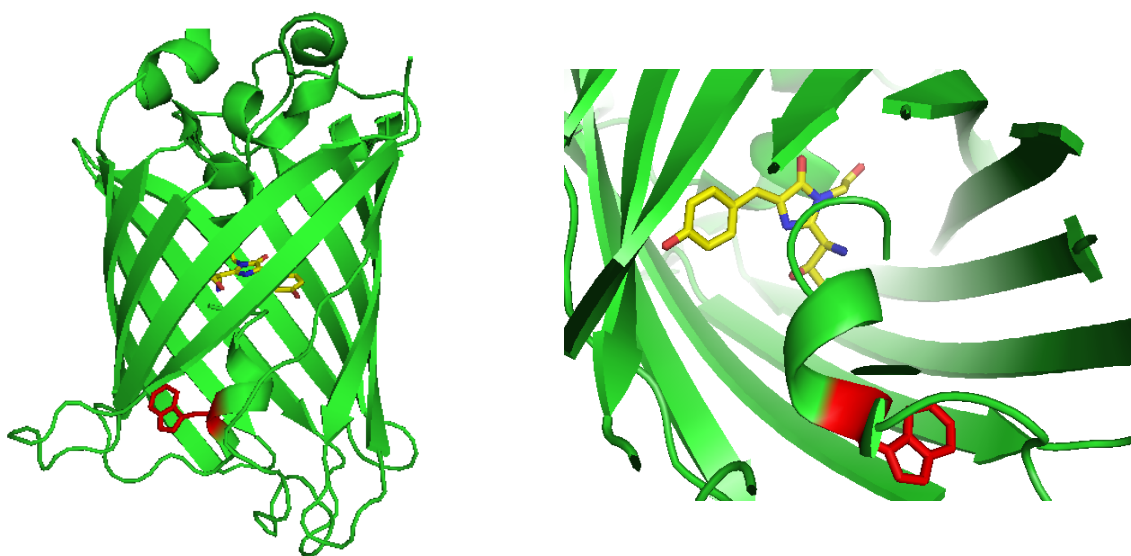


Rys. 2 Schemat zwijania jednoetapowego (panel lewy) i zwijania wieloetapowego na przykładzie mutantu GFP – Cycle 3 (panel prawy, za Enoki et al. 2004); D – stan zdenaturowany, N – stan natywny, I_{X_Y} – intermediały różnego rodzaju

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 -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.

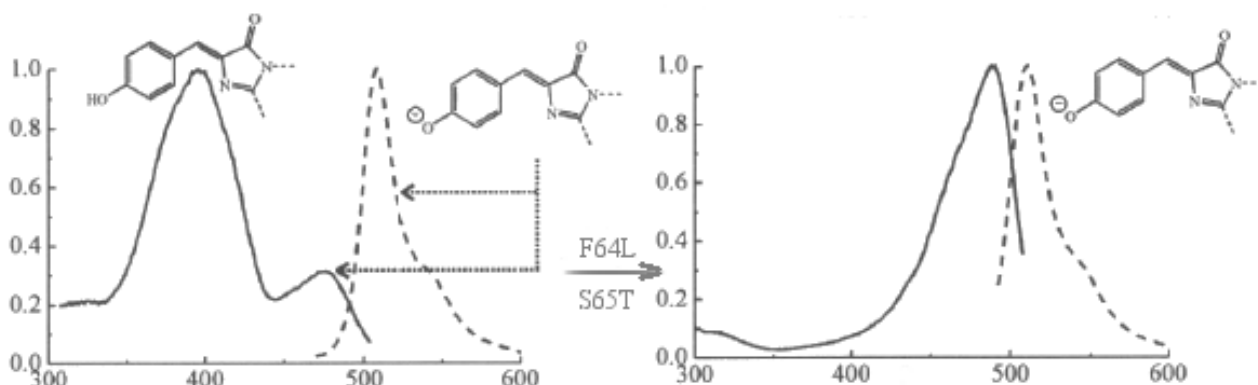


Rys. 3 Struktura mutantu F64L/S65T-GFP (lewy panel, PDB 2Y0G) oraz wnętrze β -beczki z chromoforem (żółty) i tryptofanem 57 (czerwony) (prawy panel).

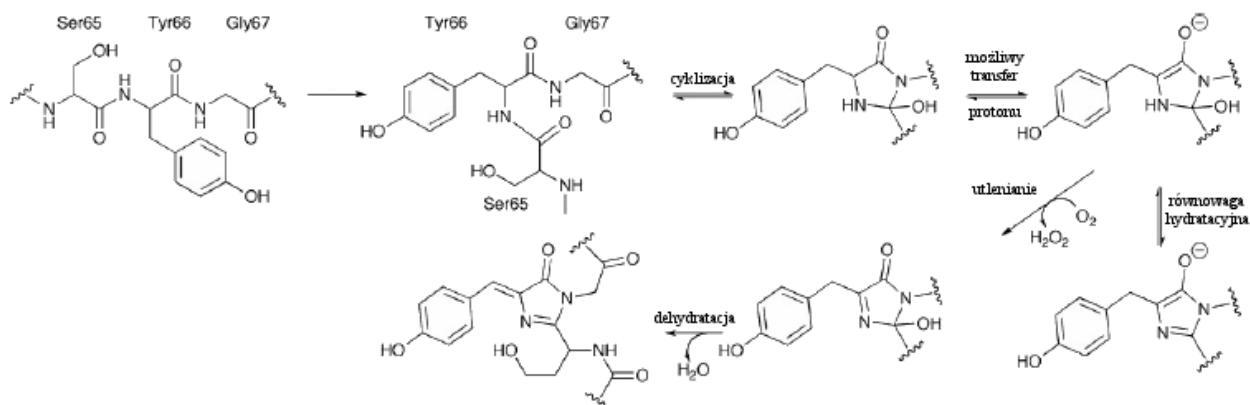
W porównaniu z typem dzikim białka zielonej fluorescencji w EGFP wprowadzono leucynę w miejsce fenyloalaniny 64 i treoninę w miejsce seryny 65. Obie te mutacje okazały się mieć bardzo duże znaczenie dla wydajniejszego zwijania, wzmocnienia intensywności fluorescencji oraz uproszczenia widma absorpcyjnego białka (Rys. 4). Związane jest to między innymi ze zmianą stanu jonowego chromoforu, który w białku dzikim występuje zarówno w formie neutralnej, jak i anionowej, 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.

Chromofor dla wtGFP powstaje z trzech aminokwasów S65-Y66-G67, czyli seryny, tyrozyny i glicyny. Poprzez wprowadzanie różnych mutacji stwierdzono, że mutacje w obrębie sekwencji chromoforu i w jego pobliżu mogą zmieniać barwę świecenia białka, natomiast by zachować właściwości fluorescencyjne konieczne jest pozostawienie glicyny w pozycji 67. Chromofor tworzy się samoistnie, jednak dopiero po przyjęciu przez białko struktury natywnej. Tylko wtedy wspomniane aminokwasy są w takim położeniu, aby mógł zajść szereg reakcji chemicznych powodujących powstanie chromoforu (Rys 5). Najpierw występuje cyklizacja tripeptydu ($\tau_c \sim 3$ min.), następnie utlenianie ($\tau_{ox} \sim 37$ min.) i dehydratacja ($\tau_H \sim 15$ min.). Kolejność wystąpienia dehydratacji i utleniania zależy od warunków środowiskowych reakcji. Dostępność tlenu jest warunkiem ograniczającym cały proces dojrzewania chromoforu. Czas utleniania zależy także od budowy danego mutantu i stała czasowa może wynosić od ~ 53 min dla wtGFP do $\sim 5,6$ min. dla GFPm (S65G/S72A/F99S/M153T/V163A-GFP). W tworzeniu chromoforu biorą też udział inne aminokwasy takie jak arginina 96 czy kwas glutaminowy 222 pełniące funkcje pomocnicze poprzez oddziaływania wodorowe lub będąc przekaźnikami ładunków.

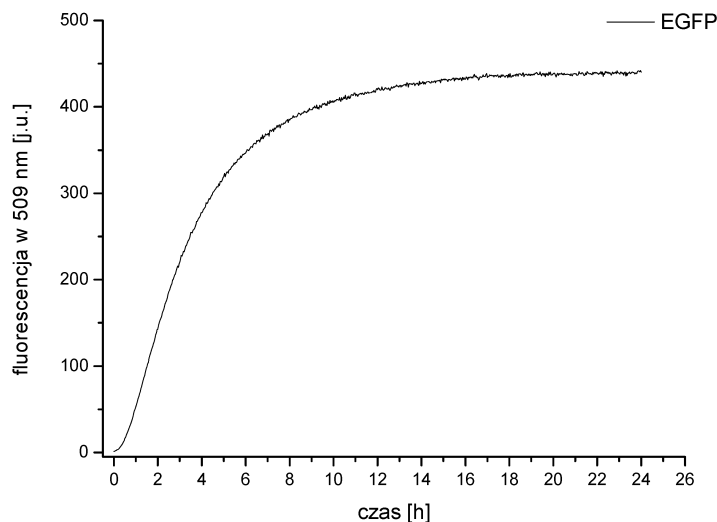


Rys. 4 Widmo wzbudzenia (ciągła linia) i emisji (przerywana linia) typu dzikiego wtGFP (lewy panel) oraz mutantu F64L/S65T-GFP (prawy panel). Rysunek za R. Y. Tsien 1998, str. 520.



Rys. 5 Kolejne etapy tworzenia chromoforu w białku zielonej fluorescencji. Rysunek za T. D. Craggs 2009, str 2870.

Przykładowy przebieg powstawania chromoforu przedstawiony został na Rys. 6. Szczególną uwagę należy zwrócić na początkowe opóźnienie we wzroście sygnału fluorescencyjnego (ang. lag phase), które związane jest ze zwijaniem białka. Proces powstawania chromoforu jest długotrwały, a jego dojrzewanie można uznać za zakończone po ok. 24 h.



Rys. 6 Przykładowy fluorescencyjny przebieg tworzenia chromoforu białka EGFP, temperatura pokojowa, pH 8, długość fali wzbudzenia $\lambda_{\text{ex}} = 447$ nm, długość fali obserwacji $\lambda_{\text{em}} = 509$ nm. (J. Krasowska et al., 2014)

Metody analizy danych

Do analizy zwijania białka GFP jak i do procesu tworzenia chromoforu stosowano funkcję multieksponencjalną, 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)

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

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

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

Studenci otrzymają stężony roztwór białka EGFP bez chromoforu w 50 mM buforze fosforanowym z 300 mM NaCl i 6M chlorowodorkiem guanidyny (GdmHCl, czynnik denaturujący), pH 8. Zwijanie białka będzie polegało na rozcieńczeniu białka w 50 mM buforze fosforanowym z 300 mM NaCl, pH 8, ale bez GdmHCl. Konieczne jest dodanie β -merkaptoetanolu do stężenia końcowego 14 mM, aby zapobiec tworzeniu się mostków disiarczkowych. Rozpoczęte w ten sposób zwijane będzie monitorowane zarówno absorpcyjnie, jak i fluorescencyjnie.

Pomiary będą przeprowadzane w kuwetach kwarcowych: absorpcyjne o drodze optycznej 10 mm, natomiast fluorescencyjna o drogach optycznych 10 mm i 4 mm, przy czym kuwetę ustawia się krótszą drogą optyczną w stronę źródła światła. Mieszanie składników będzie następowało bezpośrednio w kuwetach za pomocą mieszadła magnetycznego.

Do pomiarów będą używane spektrofotometry dwuwiązkowe Cary 100 lub Shimadzu 2401PC oraz spektrofluorymetry Perkin-Elmer LS55 lub Shimadzu RF501PC.

Zadaniem studenta będzie znalezienie odpowiednich warunków zwijania białka EGFP takich jak:

- stężenie białka w roztworze stężonym
- stężenie białka odpowiednie do pomiarów tworzenia chromoforu
- długość fali obserwacji w przypadku pomiarów absorpcyjnych
- długość fali wzbudzenia i obserwacji, szerokości szczelin oraz czułości fotopowielacza w przypadku pomiarów fluorescencyjnych.

Następnie student powinien zarejestrować kilka przebiegów tworzenia chromoforu obiema metodami. Należy dokonać analizy uzyskanych danych, najlepiej w programie Origin, wyznaczając liczbę faz przebiegu, opisując je czasy charakterystyczne oraz porównać je zarówno w ramach jednej metody, jak i między metodami pomiarowymi.

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 publikacją: T. D. Craggs, *Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation*, Chem. Soc. Rev. 2009, 38, 2865-2875, którą 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?)
 - 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.
- 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
- Białko zielonej fluorescencji (GFP)
 - budowa i działanie GFP
 - wpływ mutacji na GFP
 - tworzenie chromoforu

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) J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, 2006
- (6) T. D. Craggs, *Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation*, Chem. Soc. Rev. 2009, 38, 2865-2875
- (7) R. Izuka, M. Yamagishi-Shirasaki, T. Funatsu, *Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins*, Analytical Biochemistry 2011, 414, 173-178
- (8) 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