

# PRACOWNIA PODSTAW BIOFIZYKI

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku  
„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”  
Biofizyka molekularna

**Badanie powtórnego fałdowania białka zielonej  
fluorescencji (GFP) przy zastosowaniu techniki  
zatrzymanego przepływu**

**PPB d12**



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



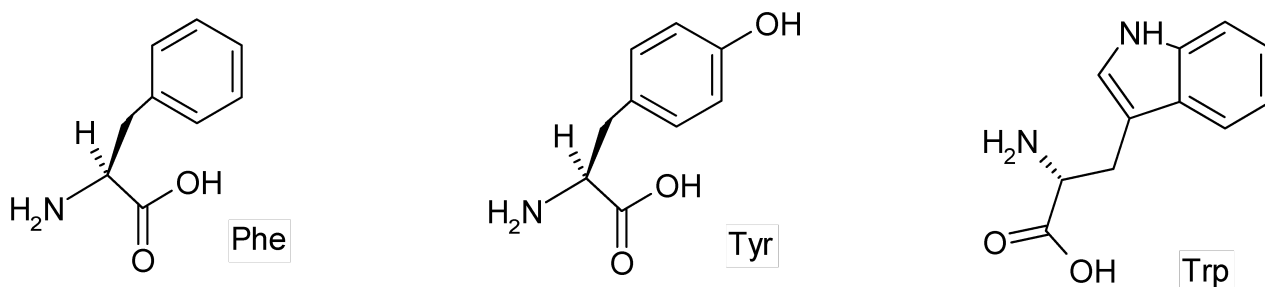
## Cel ćwiczenia

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) oraz określenie liczby etapów procesu EGFP oraz czasów charakterystycznych opisujących 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. Za właściwości te odpowiadają występujące w strukturze wymienionych aminokwasów pierścienie aromatyczne zawierające sprzężony układ  $\pi$ -elektronowy. 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. Tryptofan jest także wrażliwy na wygaszanie fluorescencji, szczególnie gdy jest wystawiony na kontakt z rozpuszczalnikiem. Ze względu na swoje właściwości tryptofan ma decydujący wpływ na kształt widma absorpcji i emisji białka, a maksimum absorpcji białka obserwuje się w 280 nm.



Rys. 1 Wzory strukturalne aminokwasów aromatycznych, od lewej: fenyloalanina (Phe, P), tyrozyna (Tyr, T), tryptofan (Trp, W)

### Zwijanie białek

Proces zwijania białek jest wciąż mało poznany i trudny do opisanie. 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.

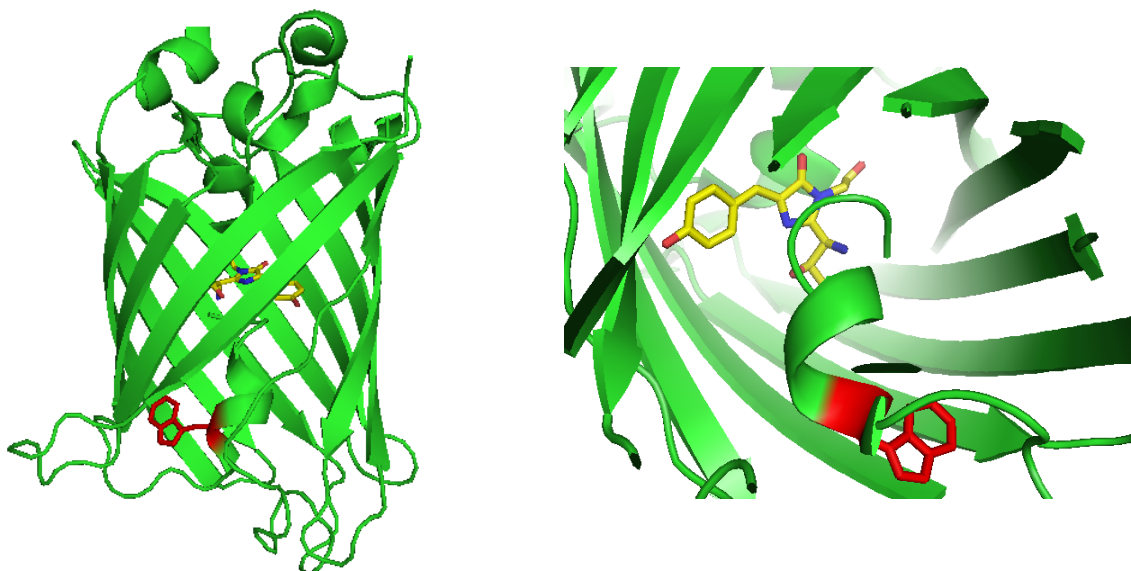
Model kolapsu hydrofobowego zakłada, że w początkowym etapie zwijania następuje kolaps hydrofobowy, czyli gwałtowne tworzenie się hydrofobowego jądra (wyrzucane są z otoczenia molekule wody oraz m.in. aminokwasy polarne), a w następnej kolejności pojawia się struktura II-rzędowa. Zanim białko zwinie 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.

Zwijanie może być jedno- lub wieloetapowe. W zwijaniu jednoetapowym następuje bezpośrednio przejście od stanu zdenaturowanego (D) do stanu natywnego (N) ( $D \rightarrow N$ ), natomiast w zwijaniu wieloetapowym występują dodatkowo stany pośrednie, intermediaty (I), które wpływają na szybkość zwijania (np. model dwuetapowy  $D \rightarrow I \rightarrow N$ ).

### **Białko zielonej fluorescencji**

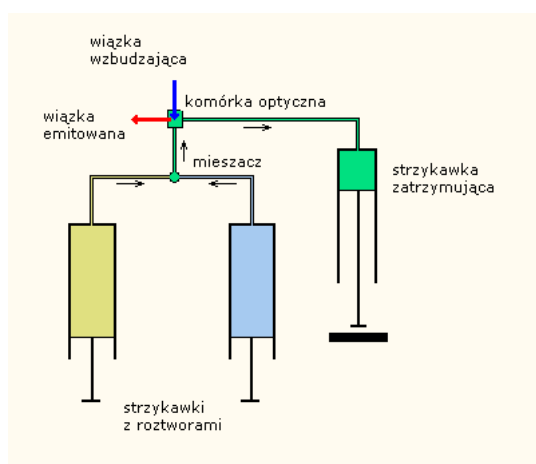
Białko zielonej fluorescencji jest niedużym białkiem globularnym (ok. 27 kDa, 238 aminokwasów) posiadającym charakterystyczną strukturę zwaną  $\beta$ -beczką (Rys. 2, panel lewy). Składa się ona z 11-antyrownoległych  $\beta$ -kartek, u jej podstawy i zwieńczenia znajdują się krótkie fragmenty helikalne i pętle, zaś przez środek biegnie  $\alpha$ -helisa, przy której znajduje się chromofor odpowiadający za barwną fluorescencję białka. Beczka stanowi szczelną osłonę chromoforu przed cząsteczkami rozpuszczalnika, które mogłyby wygaszać jego fluorescencję, ponadto sieć wiązań wodorowych utrzymuje chromofor we właściwej płaszczyźnie. U podstawy  $\beta$ -beczki znajduje się tryptofan (Rys. 2, prawy panel), który w sposób bezpromienisty przekazuje zaabsorbowaną energię na chromofor.

Chromofor tworzy się w białku autokatalitycznie. Po uzyskaniu przez białko struktury natywnej seryna 65, tyrozyna 66 i glicyna 67 znajdują się w takim wzajemnym położeniu, że zachodzi reakcja chemiczna prowadząca do cyklizacji i utworzenia struktury pierścieniowej. Następnie w procesie utleniania i dehydratacji powstaje w pełni dojrzały chromofor. W białku typu dzikiego (wtGFP) występuje on w dwóch formach jonowych, z których każda ma inne maksimum absorpcji: neutralna w ok. 395 nm, anionowa w ok. 475 nm. W mutancie o wzmocnionej fluorescencji EGFP (F64L/S65T-GFP) przeważa forma anionowa, co sprawia, że obserwowany jest pojedyncze pasmo absorpcyjne z maksimum w ok. 489 nm. Pasmo emisji pochodzące od chromoforu znajduje się w ok. 509 nm i nadaje białku jaskrawe, zielono-żółte zabarwienie. Absorpcja pochodząca od aminokwasów aromatycznych jest obserwowana w ok. 278 nm. Doświadczalnie wyznaczone współczynniki ekstynkcji w pH 7,3 wynoszą  $\epsilon_{277} = 21\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  oraz  $\epsilon_{488} = 38\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Seifert et al., 2002).



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

### Technika zatrzymanego przepływu



Rys. 3 Schemat aparatu zatrzymanego przepływu specjalnie do tego przygotowane. Wraz z postępującym (za M. Narczyk, praca magisterska, 2006)

Schemat aparatu zatrzymanego przepływu (ang. stopped-flow) przedstawiony został na Rys. 3. 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

przebiegiem 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

Proces zwijania GFP przebiega eksponencjalnie (Enoki et al. 2004 i 2006), zatem do analizy danych należy zastosować wzór

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

gdzie:

$I(t)$  – intensywność emisji fluorescencji w czasie  $t$  procesu

$i$  – liczba etapów procesu

$A_i$  – amplituda  $i$ -tego etapu

$\tau_i$  – czas charakterystyczny  $i$ -tego etapu

$A_{inf}$  – 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). Wówczas wzór (1) przyjmuje postać:

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

gdzie:

$a$  – współczynnik kierunkowy

$b$  – wyraz wolny

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

## **Przebieg ćwiczenia**

Do dyspozycji są przygotowane wcześniej roztwory potrzebne do wykonania ćwiczenia:

- 20  $\mu$ M roztwór białka EGFP w 100 mM roztworze fosforanowym pH 1
- 20  $\mu$ M roztwór białka EGFP w 100 mM buforze fosforanowym pH 8
- 100 mM bufor fosforanowy pH 8
- 100 mM roztwór fosforanowy pH 1
- 100 mM fosforanowy roztwór alkalizujący, który po zmieszaniu w proporcji 1:1 zmieni pH buforu z białkiem na pH 8, roztwór zawiera  $\beta$ -merkaptoetanol

Ponadto:

- kwarcowa kuweta fluorescencyjna o długościach drogi optycznej 10 mm i 4 mm
- spektrofluorymetr Perkin Elmer LS 55
- aparat zatrzymanego przepływu Applied Photophysics SX.18MV (droga optyczna kuwety 2 mm lub 10 mm)

1. Początkowo należy wykonać na spektrofotometrycznym widmie wzbudzenia i fluorescencji białka EGFP zarówno w stanie natywnym (pH 8), jak i zdenaturowanym (pH 1). Na ich podstawie należy wybrać właściwe długości fali wzbudzenia i obserwacji fluorescencji dla pomiarów kinetycznych.
2. Należy przeprowadzić wstępny pomiar zwijania białka na aparacie zatrzymanego przepływu, aby właściwie dobrać czas pomiaru, szerokość szczelin dla wiązki światła wzbudzającego i wiązki emisyjnej oraz napięcie na fotopowielaczu.
3. Należy przeprowadzić właściwy pomiar zwijania białka wykonując przynajmniej 10 powtórzeń pojedynczych przebiegów zwijania.
4. Przeprowadzić pomiar tła mieszaniny buforów używanych do pomiarów zwijania białka wykonując przynajmniej 10 powtórzeń.

Jeśli pomiary kinetyczne są powtarzalne, to można je uśrednić przed dalszą analizą.

## 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. Do kolokwium wstępnego można przygotowywać się z następujących podręczników:

- 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*

Zagadnienia, które mogą pojawić się na kolokwium wstępnym:

- 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 spektrofotometrycznego

- 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 ją wyznaczyć?)
- 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
- Technika zatrzymanego przepływu – zasada działania, zastosowanie
- Białko zielonej fluorescencji (GFP) – budowa i tworzenie chromoforu

## Bibliografia

1. M. Chalfie, *Green Fluorescent Protein*, Photochemistry and Photobiology 1995, 62 (4), 651-656
2. I. Żak, *Chemia medyczna*, rozdział 13 „Aminokwasy i pochodne”, Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2001
3. V. Dagget, A. Fersht, *The present view of the mechanism of protein folding*, Nature Reviews, Molecular Cell Biology 2003, 4, 497-502
4. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, 2006
5. T. D. Craggs, *Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation*, Chem. Soc. Rev. 2009, 38, 2865-2875
6. 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