

# **PRACOWNIA Z BIOFIZYKI DLA ZAAWANSOWANYCH**

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

**Wyznaczenie parametrów dynamiki rotacyjnej  
białka, na podstawie zaniku anizotropii  
fluorescencji wewnętrznej**



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

## **Wyznaczenie parametrów dynamiki rotacyjnej białka, na podstawie zaniku anizotropii fluorescencji wewnętrznej**

### **I. Wstęp**

Absorpcja fotonów przez makrocząsteczki biologiczne (np., kwasy nukleinowe, białka, chloroplasty) w zakresie długości fali 200-400 nm (bliskiego UV) lub powyżej 400 nm (światła widzialnego) może być wywołana przez sprzężone wiązania wielokrotne w zasadach kwasów nukleinowych, aminokwasach aromatycznych (tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina - absorpcja białek w zakresie bliskiego UV), oraz barwnikach takie jak chlorofil, karoten - absorpcja chloroplastów w zakresie widzialnym. Stosunkowo niska energia wzbudzenia elektronowego w tych cząsteczkach jest związana z obecnością zdelokalizowanych wiązań typu  $\pi$ , które są przyczyną także płaskiego charakteru tych cząsteczek. Cząsteczki powiązane takim układem wiązań zachowują płaską strukturę, orbitale p prostopadłe do płaszczyzny cząsteczki mogą się nakładać i tworzyć wielocentrowe czyli zdelokalizowane orbitale cząsteczkowe tzw. orbitale  $\pi$ . W ogólności możemy mówić o stanach elektronowo-oscylacyjno-rotacyjnych cząsteczek, przy czym w środowisku wodnym w laboratorium lub w środowisku biologicznych wewnątrz żywych komórek lub tkanek najważniejsze są stany elektronowo-oscylacyjne. Ponadto w temperaturze pokojowej cząsteczki te znajdują się w podstawowym stanie oscylacyjnym podstawowego stanu elektronowego.

Absorpcja fotonu o energii równej różnicy między dozwolonymi stanami elektronowymi powoduje przejście cząsteczki ze stanu podstawowego do wzbudzonego stanu elektronowego, natomiast przejście odwrotne jest realizowane poprzez emisję fotonów zwaną fluorescencją. Zarówno po absorpcji jak i po emisji kwantu światła cząsteczka może znaleźć się w podstawowym lub wzbudzonym stanie oscylacyjnym. Dezaktywacja bezpromienista stanu oscylacyjnego odbywa się bardzo szybko i emisja fotonu odbywa się z podstawowego stanu oscylacyjnego. Absorpcja i emisja zależą od właściwości fizycznych badanej cząsteczki i jej oddziaływania z innymi cząsteczkami (otoczeniem), zarówno w stanie podstawowym jak i wzbudzonym.

Wybór spektroskopii emisyjnej jako podstawowego narzędzia badawczego wynika m.in. z następujących obserwacji. Po pierwsze, chociaż metody spektroskopii emisyjnej stanów elektronowych cząsteczek biologicznych i ich kompleksów nie udzielają tak precyzyjnej informacji o strukturze jak krystalografia lub spektroskopia wielowymiarowego magnetycznego rezonansu magnetycznego (NMR), to można je uznać za komplementarne, a nawet posiadające większe możliwości. Dostarczają bowiem informacji o strukturze, oddziaływaniach i dynamice układów cząsteczkowych w roztworze, tj. w warunkach zbliżonych do takich jakie są w żywych komórkach i tkankach. W przypadku białek (enzymów) możemy to sprawdzić m.in. na podstawie pomiaru ich aktywności katalitycznej wobec typowych ligandów (substratów, inhibitorów) oraz na podstawie wpływu oddziaływania białek z ligandami na emisję znaczników emisyjnych przyczepionych kowalencyjnie do białek i ligandów.

## Dyfuzja

Przemieszczanie się lub obrót cząsteczek i makrocząsteczek w roztworze przy braku sił zewnętrznych jest wywołane dyfuzją, odpowiednio translacyjną lub rotacyjną. Nieustanne chaotyczne ruchy, nazywane ruchami Browna, powoduje energia cieplna. Do opisu procesu dyfuzji rotacyjnej wykorzystywany jest współczynnik dyfuzji rotacyjnej ( $D_R$ ) oraz zależność

$$D_R = 1/(6\Theta_R),$$

gdzie:  $\Theta_R$  — czas korelacji rotacyjnej.

Dyfuzja rotacyjna jest odpowiedzialna za depolaryzację fluorescencji białka poprzez zanik jej anizotropii opisany zależnością wielowymiarową

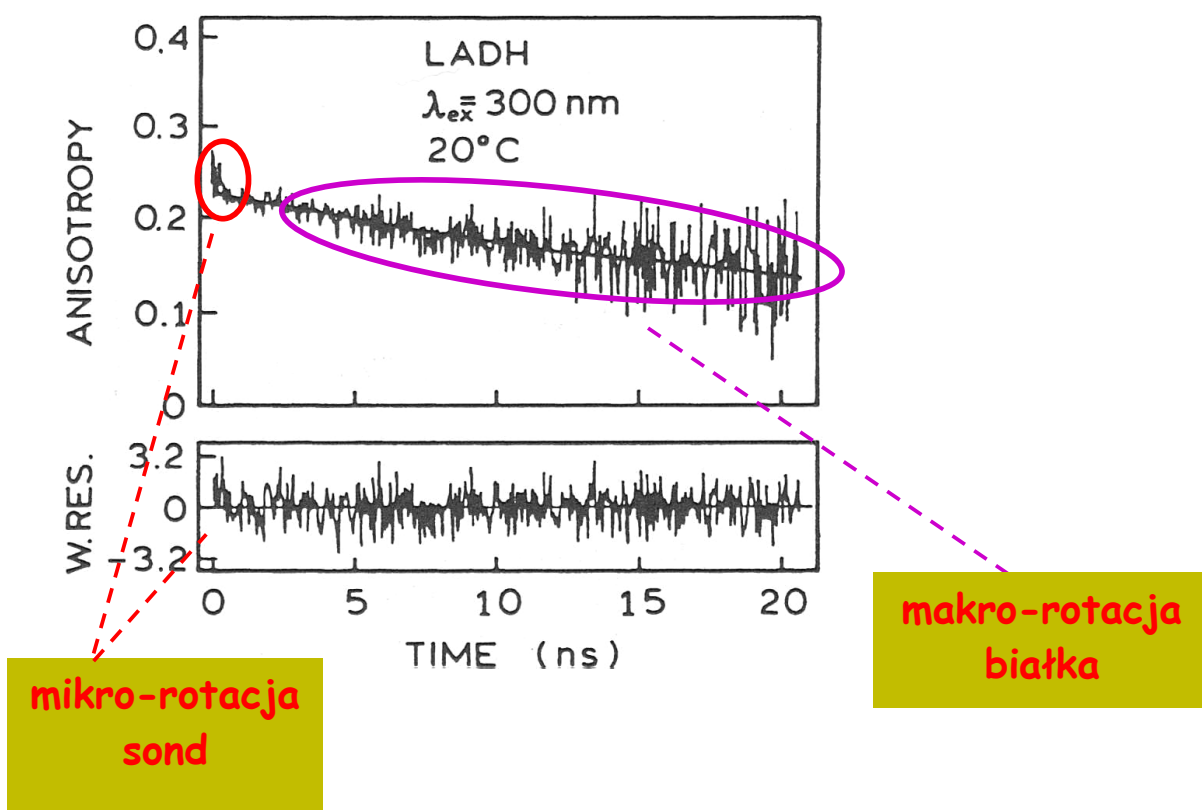
$$r(t) = \sum r_{oi} \exp(-t/\Theta_{Ri})$$

Badania dyfuzji rotacyjnej, najczęściej oparte o czasowo-rozdzielcze zaniki anizotropii fluorescencji, przyczyniają się do pogłębienia wiedzy o dynamice molekularnej makrocząsteczek biologicznych (białek). Czasowo-rozdzielcze zaniki anizotropii  $r(t)$  wyznacza się z równania

$$r(t) = (F_{vv}(t) - gF_{vh}(t))/(F_{vv}(t) + 2gF_{vh}(t)), \quad g = F_{hv}/F_{vh},$$

gdzie  $F_{vv}(t)$  i  $F_{vh}(t)$  — natężenie emisji fluorescencji dla wertykalnej ( $v$ ) i horyzontalnej ( $h$ ) obserwacji przy wertykalnym wzbudzeniu;  $F_{hv}(t)$  i  $F_{hh}(t)$  — natężenie emisji fluorescencji dla wertykalnej i horyzontalnej obserwacji przy horyzontalnym wzbudzeniu.

Jako przykład warto omówić pomiary dyfuzji rotacyjnej wykonane dla dehydrogenazy alkoholowej LADH (MW = 2 x 40000) z wątroby konia (Rys. 1), gdzie przewidywana wartość czasu korelacji rotacyjnej  $\Theta_R$  wynosi 31 ns. Anizotropia fluorescencji LADH,  $\lambda_{exc} = 300$  nm, zanika od  $r(t = 0) = 0.22$  z czasem charakterystycznym korelacji rotacyjnej  $\theta_R = 33$  ns. Białko tego enzymu zawiera dwie reszty tryptofanowe Trp-15 (eksponowaną) i Trp-314 (zanurzoną). Poza składnikiem długożyciowym reprezentującym dynamikę (makro-rotację) całego białka obecny jest także składnik krótkożyciowy reprezentujący mikro-rotację tych dwóch sond tryptofanowych.



Rys. 1

Dynamika zaniku anizotropii fluorescencji dehydrogenazy alkoholowej (LADH) z wątroby konia

## Parametry hydrodynamiczne a kształt cząsteczki

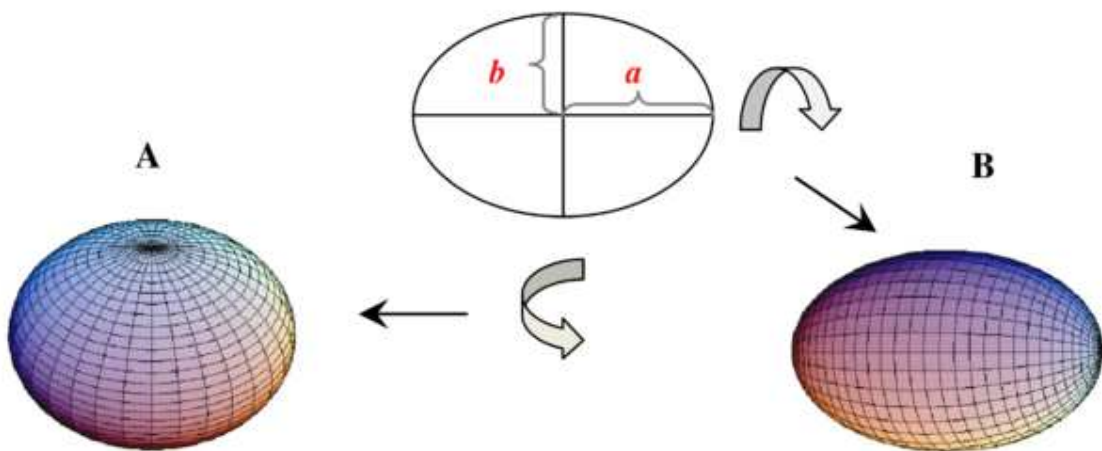
Współczynnik dyfuzji  $D_R$  zależy od współczynnika tarcia obrotowego  $f_o$ , który z kolei pozostaje w ścisłym związku z kształtem poruszającej się cząsteczki. W przypadku gdy cząsteczka jest kulą o promieniu  $R_k$  współczynnik tarcia  $f_o$  opisuje wzór Stokesa

$$f_o = 6\pi\eta R_k = 6\pi\eta(3Mv_s/(4\pi))^{1/3}$$

gdzie  $\eta$  - lepkość,  $M$  – masa cząsteczkowa,  $v_s$  – objętość specyficzna.

Ze względu na to, że siła tarcia zależy od pola powierzchni badanej cząsteczki, a sfera ma najmniejszą powierzchnię spośród wszystkich brył geometrycznych o tej samej objętości, współczynniki tarcia cząsteczek sferycznych są zawsze mniejsze niż niesferycznych.

Kształt większości makrocząsteczek biologicznych odbiega od kształtu idealnej kuli. Można jednak zmodyfikować wzór tak by opisywał współczynnik tarcia  $f$  cząsteczek o kształcie spłaszczonej lub wydłużonej elipsoidy obrotowej (Rys. 2).



Rys. 2

Elipsoidy obrotowe powstające poprzez obrót elipsy wokół osi małej (elipsoida spłaszczona, A) lub powstające poprzez obrót elipsy wokół osi wielkiej (elipsoida wydłużona, B)

Długości dwóch osi symetrii — wielkiej ( $2a$ ) i małej ( $2b$ ) są parametrami charakteryzującymi elipsoidę obrotową. Wartości stosunku  $f/f_o$  w zależności od wartości stosunku  $a/b$  (Rys. 2) dla elipsoid wydłużonych i spłaszczonych zostały po raz pierwszy obliczone przez Perrina i są dostępne w formie tabel. Na przykład dla wartości stosunku  $a/b = 5$  stosunek  $f/f_o$  wynosi 1.25 lub 1.22, odpowiednio dla elipsoidy wydłużonej i spłaszczonej. Wartość stosunku  $f/f_o$  jest

więc miarą stopnia asymetrii badanej makrocząsteczki, tj. stopnia w jakim jej kształt odbiega od kształtu sferycznego.

Wielkość czasu korelacji rotacyjnej można wyrazić za pomocą masy cząsteczkowej, objętości całkowitej i specyficznej makrocząsteczek biologicznych oraz lepkości i temperatury ośrodka

$$\Theta_R = (1/6D_R) = \eta V_C / (RT) = \eta M v_s / (RT),$$

gdzie  $D_R$  – współczynnik dyfuzji rotacyjnej [s<sup>-1</sup>],  $\eta$  – lepkość [kg m<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>],  $V_C$  - objętość całkowita rotującego białka [m<sup>3</sup>],  $T$  – temperatura [K],  $R$  - stała gazowa (8.314 J.K<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>),  $M$  - masa cząsteczkowa,  $v_s$  – objętość specyficzna białka [m<sup>3</sup>mol<sup>-1</sup>, m<sup>3</sup>g<sup>-1</sup> lub mlg<sup>-1</sup>].

Wysoki stopień skomplikowania białek (enzymów) oraz niski poziom wiedzy (bio)fizycznej o podstawowych oddziaływaniach fizycznych (np. wewnątrz- i między-cząsteczkowych oddziaływaniach elektrostatycznych) jest najczęstszym źródłem wielu konkurencyjnych i wzajemnie wykluczających się modeli rozpoznawania się enzymów i ligandów (substratów, inhibitorów) jak również nieściśłych i sprzecznych modeli reakcji enzymatycznych. Pracownia dotyczy zbadania zaniku anizotropii białka jednotryptofanowego, albuminy surowicy ludzkiej (HSA), określenia czasu korelacji rotacyjnej ( $\Theta_R$ ) i parametrów hydrodynamicznych białka, tj. współczynników dyfuzji rotacyjnej ( $D_R$ ) oraz jego objętości całkowitej i specyficznej. Podjęte będą także próby uogólnienia obserwacji na wszystkie enzymy danej wielkości. Projekt pracowni przewiduje także wprowadzenie do metodologii pracy z makrocząsteczkami biologicznymi (białkami) i zapoznanie się z nowoczesnymi technikami spektroskopii fluorescencyjnej wysokiej rozdzielczości czasowej. W badaniach tych uwzględniony będzie wpływ temperatury i lepkości środowiska wodnego na zanik anizotropii fluorescencji białka oraz wielkość czasu korelacji rotacyjnej, współczynników dyfuzji rotacyjnej i objętość białka.

## II. Wymagania przy kolokwium wstępnym

Warunkiem przystąpienia do części eksperymentalnej ćwiczenia jest zaliczenie kolokwium wstępnego. Wybór sposobu przeprowadzenia kolokwium wstępnego tj forma pisemna czy ustna, pytania otwarte czy zamknięte – należy do prowadzącego ćwiczenie.

1. Materiał z zakresu spektroskopii molekularnej absorpcyjnej i emisyjnej oraz zastosowania spektroskopii do badania właściwości molekuł obowiązujący w czasie kolokwium wstępnego jest zawarty np. w książkach:

Kęckiego *Podstawy spektroskopii molekularnej*,  
Barrowa, *Wstęp do spektroskopii molekularnej*

Kowalczyka *Fizyka cząsteczek*

JR Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*

2. Materiał z zakresu budowy badanych molekuł i ich roli biologicznej obowiązujący w czasie kolokwium wstępnego jest zawarty np. w książkach:

Fishera i Arnolda *Chemia dla biologów, krótkie wykłady*

Hamesa i Hoopera *Biochemia, krótkie wykłady*

Z książek tych (lub innych podanych na końcu opisu w sekcji Literatura) należy przeczytać tylko tyle, aby być przygotowanym do omówienia poniższych zagadnień:

1. Podstawowe definicje związane z promieniowaniem elektromagnetycznym i pomiarami spektroskopowymi oraz stanami elektronowo-oscyłacyjnymi cząsteczek.
2. Pomiar absorpcji promieniowania elektromagnetycznego
  - schematyczne przedstawienie zasady pomiarów absorpcji (spektrofotometr jedno- i dwuwiązkowy)
  - co rozumiemy pod pojęciem widmo absorpcyjne?
  - ilościowy opis absorpcji (parametry pasma spektralnego)
  - czynniki determinujące kształt i szerokość konturu pasma absorpcyjnego
3. Absorpcyjne widmo elektronowe ze strukturą oscylacyjną i prawo Lamberta-Beera.
4. Metoda pomiaru widm emisji i wzbudzenia fluorescencji oraz zaniku anizotropii fluorescencji i jej zależność od czasu:
  - czas korelacji rotacyjnej;
  - definicja współczynnika dyfuzji rotacyjnej;
  - zależność czasu korelacji rotacyjnej od masy cząsteczkowej, objętości, lepkości i temperatury;

### **III. Badane obiekty:**

W ćwiczeniu rejestruje się i analizuje absorpcyjne widma elektronowe roztworów wodnych składników białek czyli wybranych aminokwasów oraz widmo białka (albuminy surowicy ludzkiej).

Badane w ćwiczeniu związki to:

Wybrane aminokwasy aromatyczne – fenyloalanina, tryptofan, tyrozyna

Białko (np. albumina surowicy ludzkiej)

### **IV. Przebieg ćwiczenia:**

Studenci otrzymują przygotowane wcześniej roztwory wodne badanych związków (w buforze o pH 7.0). Stężenie roztworów jest znane i odpowiednie do rejestracji widm przy użyciu dostępnych spektrofotometrów. Wszystkie widma będą rejestrowane dla roztworów umieszczonych w kuwetach kwarcowych o długości drogi optycznej 1 cm. Objętość badanego roztworu w kuwecie powinna być równa 2 ml. Ćwiczenie wykonywane jest na spektrofotometrze dwuwiązkowym pracującym w zakresie promieniowania UV-VIS (Varian 50Bio) oraz na spektrofluorymetrze wysokiej rozdzielczości czasowej Chronos (ISS).

Wykonanie ćwiczenia:

1. Zapoznanie się ze spektrometrem absorpcyjnym pracującym w zakresie promieniowania UV-VIS oraz spektrofluorymetrem wysokiej rozdzielczości czasowej Chronos (ISS).
2. Sprawdzenie przepuszczalności stosowanego 20mM buforu hepes (pH 7) i kuwet kwarcowych czyli rejestracja ich widm w zakresie 200-400 nm.
3. Rejestracja widm absorpcyjnych roztworów tyrozyny, tryptofanu i HSA w zakresie 200-400 nm (zdolność rozdzielcza spektrofotometru 1 nm).
4. Rejestracja wszystkich zaników anizotropii albuminy surowicy ludzkiej w roztworze wodnym w którym lepkość zmniejszała się przy wzroście temperatury, jeżeli lepkość ta dla poszczególnych temperatur wynosi  $\eta = 1.13 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $T = 15.4 \text{ }^\circ\text{C}$ ),  $\eta = 10^{-3} \text{ kg s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) i  $\eta = 0.37 \cdot 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $T = 44.4 \text{ }^\circ\text{C}$ ).
5. (Stałe fizyczne:  $N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ,  $R = 8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ,  $k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ )
6. Po rejestracji wszystkich widm pliki należy przesłać na własne konto pocztowe lub przegrać na własny pendrive. W przypadku plików rejestrowanych przez niektóre spektrofotometry konieczna jest konwersja plików do formatu tekstowego.

## V. Raport z wykonanego ćwiczenia

W opisie ćwiczenia należy uwzględnić *Wstęp*, w którym mogą być omówione ogólne zagadnienia spektroskopii absorpcyjnej i emisyjnej, mające związek z wykonywanym zadaniem, oraz *Materiały i metody*, w których należy przedstawić stosowaną aparaturę, badane związki i warunki pomiarów. Następnie, w części *Wyniki i Dyskusja* należy przedstawić, opisać i zinterpretować zarejestrowane widma absorpcji, zaniki anizotropii i wykonane obliczenia czasów korelacji rotacyjnej, współczynników dyfuzji oraz objętości całkowitej i specyficznej badanego białka.

1. Interpretacja widma kontrolnego kuwety i rozpuszczalnika (wody, buforu). Dlaczego musimy używać kuwety kwarcowej a nie szklanej ?
2. Analiza zależności zarejestrowanych widm absorpcyjnych od budowy cząsteczek, tj. porównanie widm aminokwasów aromatycznych i widma białka.
3. Jakie są charakterystyczne długość fali absorpcji dla białek i ich składników?
4. Analiza zaniku anizotropii albuminy surowicy ludzkiej i wyznaczenie wartości czasów korelacji rotacyjnej, współczynników dyfuzji i objętości całkowitej i specyficznej.



## VI. Literatura

- JR Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*  
Z. Kęcki, *Podstawy spektroskopii molekularnej*  
G. Barrow, *Wstęp do spektroskopii molekularnej*  
Praca zbiorowa pod redakcją W. Zielińskiego i A. Rajcy *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*  
J. A. Barltrop i J. D. Coyle, *Fotochemia, podstawy*  
P. Kowalczyk *Fizyka cząsteczek*  
J. Sadlej *Spektroskopia molekularna*  
J. Fisher, J.R.P. Arnold *Chemia dla biologów, krótkie wykłady*  
B.D. Hames, N.M. Hooper *Biochemia, krótkie wykłady*

A także, w razie potrzeb:

- H. Haken, H. C. Wolf, *Fizyka molekularna z elementami chemii kwantowej*  
H. A. Staab, *Wstęp do teoretycznej chemii organicznej*  
W. Kołos, *Chemia kwantowa*  
J. Simons, *Fotochemia i spektroskopia*  
L. A. Kazicyna i N. B. Kupletska, *Metody spektroskopowe wyznaczania struktury związków organicznych*

### Tabela VII.1: Tabela współczynników ekstynkcji i mas molowych badanych związków

Jeśli nie zaznaczono inaczej, współczynniki dotyczą formy neutralnej pierścienia aminokwasu i zaczerpnięto je z: R.M.C. Dawson, D. Elliott, W.H. Elliott, K.M. Jones (Eds.), *Constituents of RNA and related compounds, and spectral data and pK values for purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides*, in: *Data for Biochemical Research*, Oxford University Press, Oxford, 1969, pp. 145-179.

G. D. Fasman, *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Proteins, I*, 183-203, CRC Press, 3 ed., 1976

Związek	Długość fali [nm]	Współczynnik ekstynkcji [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	pK
Tyrozyna	274	1 400 <sup>a</sup>	10.1 <sup>b</sup>
Tryptofan	278	5 600 <sup>a</sup>	*
HSA	278		

\*Nie występuje jonizacja w obrębie pierścienia heterocyklicznego



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