

Badania metodami biofizycznymi procesu przyjmowania struktury natywnej i właściwości białek z rodziny GFP

Streszczenie

Białko zielonej fluorescencji, GFP, pochodzące z meduzy *Aequorea victoria*, jest pierwszym odkrytym z rodziny białek fluorescencyjnych, które stały się popularnymi znacznikami fluorescencyjnymi stosowanymi w wizualizacji procesów zachodzących w komórkach. Białka fluorescencyjne wykorzystywane są m.in. do monitorowania zachowania makromolekuł w czasie rzeczywistym, jako białka reporterowe, jako specyficzne biosensory zmian pH i stężenia jonów, a także dzięki wykorzystaniu zjawiska rezonansowego transferu energii Förster'a (FRET) np. do badania zwijania białek lub obserwacji łączenia się ligandów z docelowymi obiektami. Są one uważane za znacznik obojętny dla organizmów żywych.

Właściwości fluorescencyjne GFP zyskuje po utworzeniu struktury natywnej podczas reakcji autokatalitycznej, w której uczestniczą trzy aminokwasy: seryna 65 – tyrozyna 66 – glicyna 67. W jej wyniku powstaje chromofor zdolny do absorpcji i emisji światła w zakresie widzialnym. Chromofor stanowi trwałą post-translacyjną modyfikację łańcucha polipeptydowego, która może wpływać na przebieg procesu powtórnego zwijania w porównaniu ze zwijaniem białka, które jeszcze nigdy go nie utworzyło (zwijanie *de novo*). W niniejszej pracy przedstawiłam wyniki badań przeprowadzonych dla mutantu GFP o wzmocnionej fluorescencji (EGFP) porównujące zwijanie *de novo* z opisanym w literaturze powtórnym zwijaniem. Na tej podstawie zaproponowałam po raz pierwszy model zwijania *de novo* i powtórnego zwijania uwzględniający zjawisko agregacji. Zasugerowałam również interpretację poszczególnych faz tych procesów. Korzystając z różnorodnych metod spektroskopowych stwierdziłam, że obecność chromoforu wpływa na stan rozwiniętego białka w pH 1 oraz na przebieg zwijania i towarzyszącej mu agregacji. Zwijanie powtarne i *de novo* jest wieloetapowe, podąża równoległymi ścieżkami zwijania, a największe różnice występują w fazach początkowych, w tym również w czasie martwym pomiaru. Jedynie w przypadku powtórnego zwijania niektóre fazy związane są wyłącznie ze zmianami fluorescencji chromoforu, a zatem i jego otoczenia, natomiast w obydwu przypadkach fałdowania występuje zjawisko izomeryzacji prolin. Podczas powtórnego zwijania 90% intensywności świecenia białka uzyskuje się po ok. 20 min., natomiast dla zwijania *de novo* czas ten, ze względu na tworzenie chromoforu, wynosi około godziny. Agregacja towarzysząca fałdowaniu EGFP różni się dynamiką procesu i jego wydajnością – gdy jest związana z powtórnym zwijaniem, faza nukleacji jest krótsza, natomiast wydajność jest mniejsza w porównaniu z wynikami uzyskanymi podczas fałdowania *de novo*. Zatem duże znaczenie dla wyników badań prowadzonych z udziałem GFP jako znacznika fluorescencyjnego ma fakt, czy użyto białka, które dopiero utworzy, czy już posiada dojrzały chromofor.

Dodatkowe eksperymenty dotyczące agregacji podczas zwijania *de novo*, wykonane metodą ultrawirowania analitycznego, wykazały, że właściwości fluorescencyjne posiada jedynie prawidłowo zwinięty monomer EGFP. Natomiast pomiary absorpcyjne wskazały na

występowanie nieświecących form zagregowanego białka i monomerów bez funkcjonalnego chromoforu. Jest zatem istotne, by w badaniach wykorzystujących obserwację GFP jako markera fluorescencyjnego uwzględniać możliwość występowania nieświecących form białka, których pominięcie może powodować błędy w interpretacji danych.

Przeprowadzając badania nad przyczyną braku fluorescencji mutantu S65T/G67A-GFP w porównaniu z białkiem S65T-GFP, włączyliśmy się do trwającej od blisko 30 lat dyskusji dotyczącej mechanizmu tworzenia chromoforu. Pomiary spektrometrii mas wskazują, że w białku S65T/G67A-GFP podczas procesu formowania chromoforu została zablokowana reakcja utleniania. Co za tym idzie, przynajmniej dla rodziny białek GFP z mutacją S65T tworzenie chromoforu przebiega w kolejności: cyklizacja – dehydratacja – utlenianie.

Jednym z badanych zjawisk była zdolność białka GFP do wytwarzania nowych lub wygaszania reaktywnych form tlenu (ROS). Do oceny tych właściwości wykorzystaliśmy pomiary metodą elektronowego rezonansowego paramagnetycznego. Wyniki eksperymentów świadczą o braku predyspozycji do wytwarzania ROS przez EGFP, w przeciwieństwie do niektórych białek fluorescencyjnych, np. KillerRed. Natomiast EGFP wykazywało zdolność wygaszania ROS, za co, jak wykazaliśmy, może być odpowiedzialny chromofor ulegający uszkodzeniu pod wpływem wolnych rodników powstających podczas intensywnego oświetlenia. Zatem, podobnie jak sugeruje się dla białek fluorescencyjnych występujących w koralowcach, GFP może pełnić rolę fotoochronną. Wydajność wygaszania ROS przez EGFP była porównywalna z tą obserwowaną dla BSA i papainy, które wykazują działanie ochronne przed ROS.

Uzyskałam również nowe mutanty białka EGFP: C48S-EGFP i C70S-EGFP, posiadające w sekwencji pojedynczą cysteinę. Wprowadzone mutacje nie wpłynęły na właściwości absorpcyjne i fluorescencyjne chromoforu, natomiast w porównaniu z C70S-EGFP mutant C48S-EGFP jest bardziej stabilny i ma krótszy czas dojrzewania chromoforu. Jest on więc bardziej odpowiedni do badań właściwości białek fluorescencyjnych z użyciem na przykład znaczników spinowych, wybiórczo wiążących się z cysteinami i charakteryzujących ich najbliższe otoczenie.