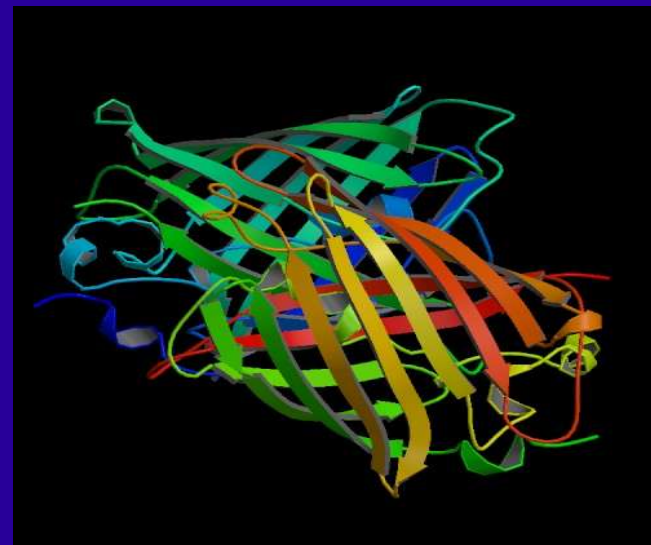


Badanie procesów zwijania i agregacji GFP i jego mutantów.

Monika Olasek, Zakład Biofizyki IFD UW

Plan

- O Green Fluorescent Protein i jego mutantach
- Absorpcyjne badanie agregacji EGFP
- Emisyjne badanie agregacji i zwijania EGFP i GFP
- Co wyszło na żelu?
- Podsumowanie



GFP – co to jest?

Green Fluorescent Protein to białko wyizolowane z meduzy *Aequorea victoria*. Charakteryzuje się naturalną fluorescencją w obszarze widzialnym – maksimum emisji chromoforu przypada na 508 – 510nm;

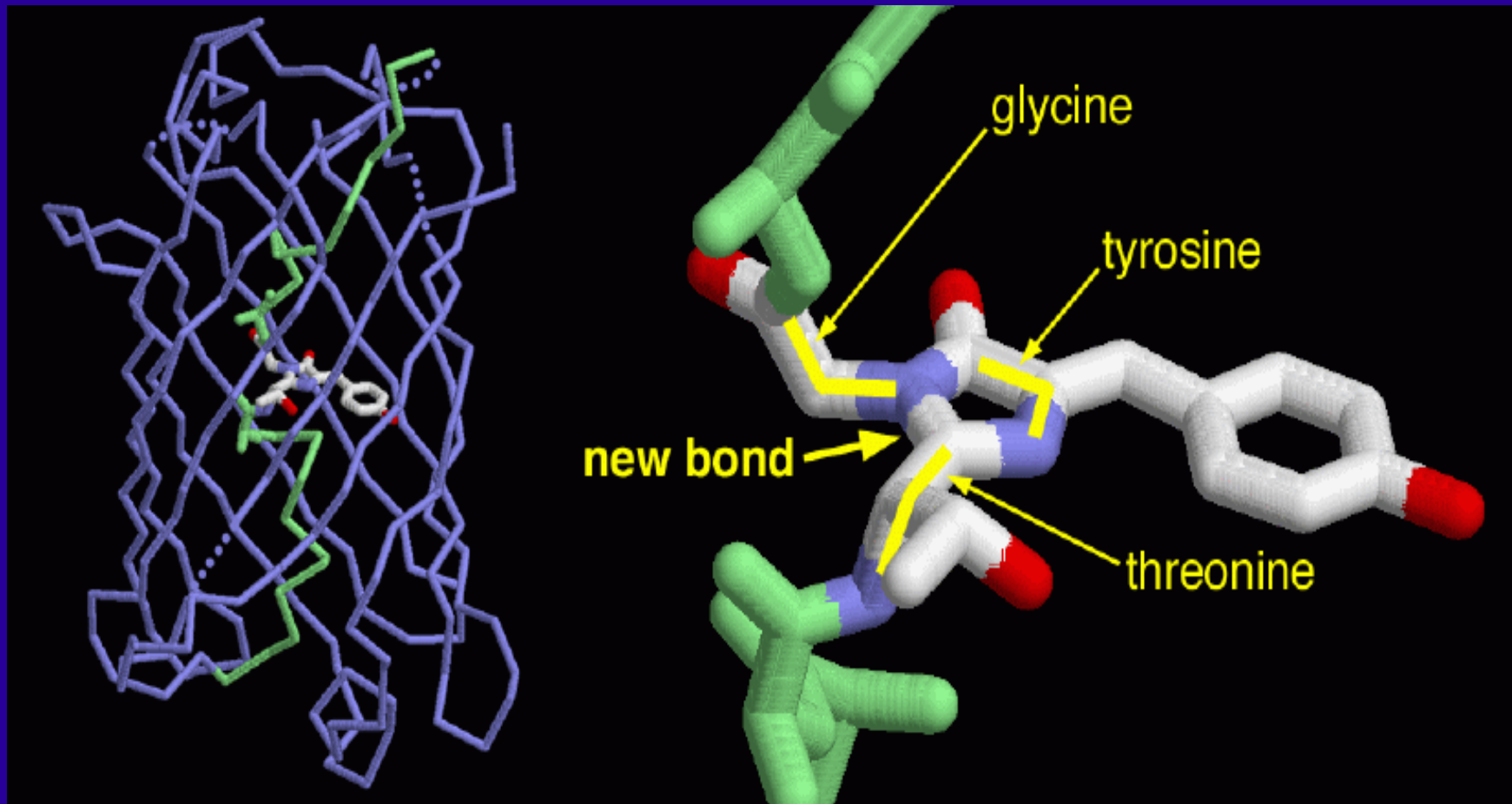
Jest to małe białko – 238 aminokwasów, Charakterystyczna struktura – 11-kartkowa β -beczka z umieszczoną wewnątrz helisą; 3 aminokwasy wchodzące w skład helisy tworzą chromofor.

Dlaczego świeci?

- ma 1 tryptofan (Trp57) i 13 tyrozyn – to są aminokwasy aromatyczne, fluoryzujące w obszarze ultrafioletowym – jest to fluorescencja charakterystyczna dla białek.
- trzy aminokwasy: **S65**, **Y66** i **G67** cyklizują ulegają dehydrogenacji i dehydratacji tworząc chromofor, czyli strukturę zdolną do absorpcji promieniowania i do fluorescencji

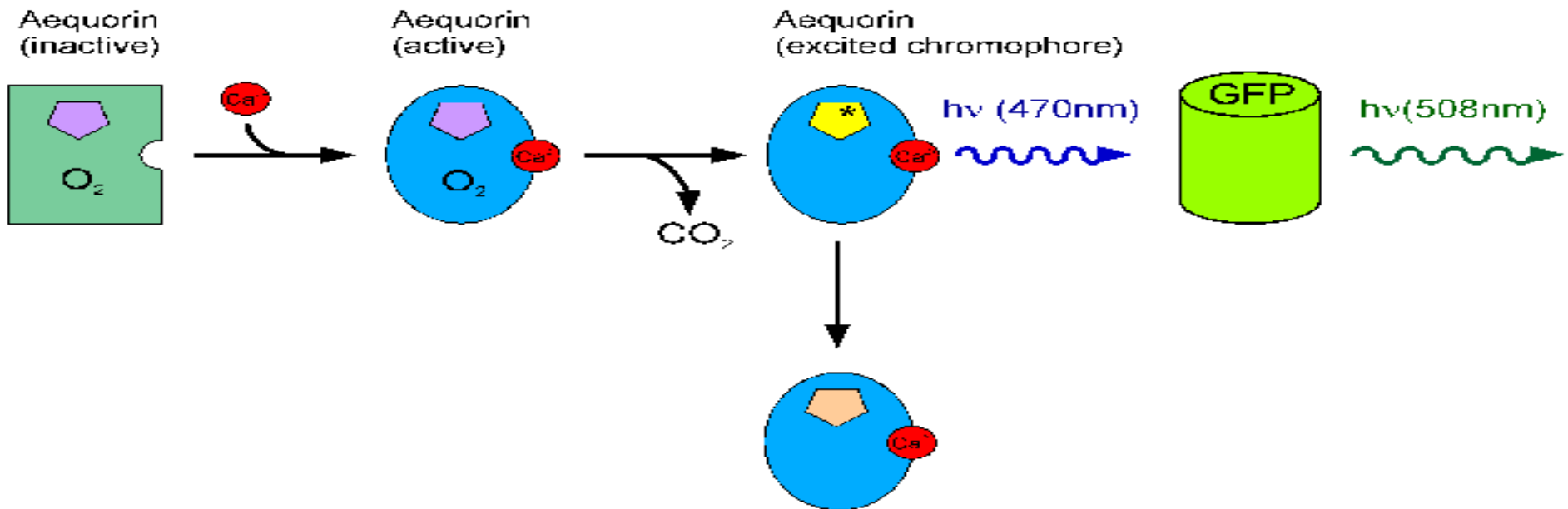
Oczywiście za zainteresowanie GFP odpowiada ten drugi rodzaj świecenia – w obszarze widzialnym.

Jak wygląda GFP?



GFP - odkrycie

Meduza ma fluoryzujące białko akweorynę (światło niebieskie).
Meduza świeci na zielono. Zaczęto szukać i znaleziono GFP.



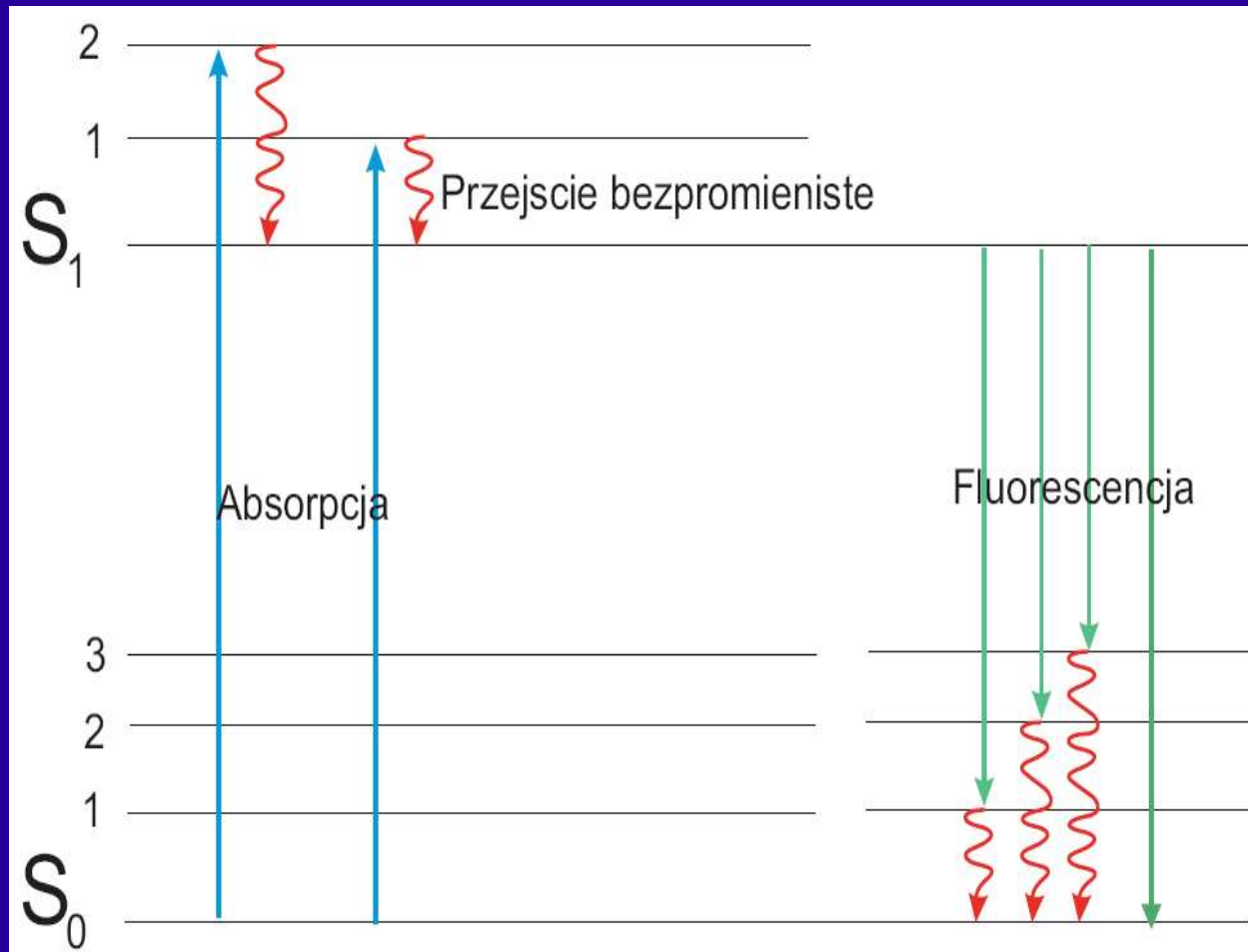
Mutanty

Mutanty dzielimy na :

- świecące: [S65T](#) (laboratoryjny “dziki typ” z uproszczonym widmem absorpcji), [S65T/F64L](#) (tzw. EGFP enhanced GFP – wzmacnione GFP – fluoryzuje ok. 10 razy silniej od typu dzikiego)
- nieświecące: [S65T/G67A](#) (mutacja na glicynie wchodzącej w skład chromoforu, takie mutanty zawsze są nieświecące)

Oczywiście jest o wiele więcej mutantów, świecących różnymi kolorami

Oddziaływanie prom. e-m z materią



Jeżeli energia fali
jest równa
energii przejścia,
to
promieniowanie
może zostać
pochłonięte
(zaabsorbowane)
przez cząsteczkę.

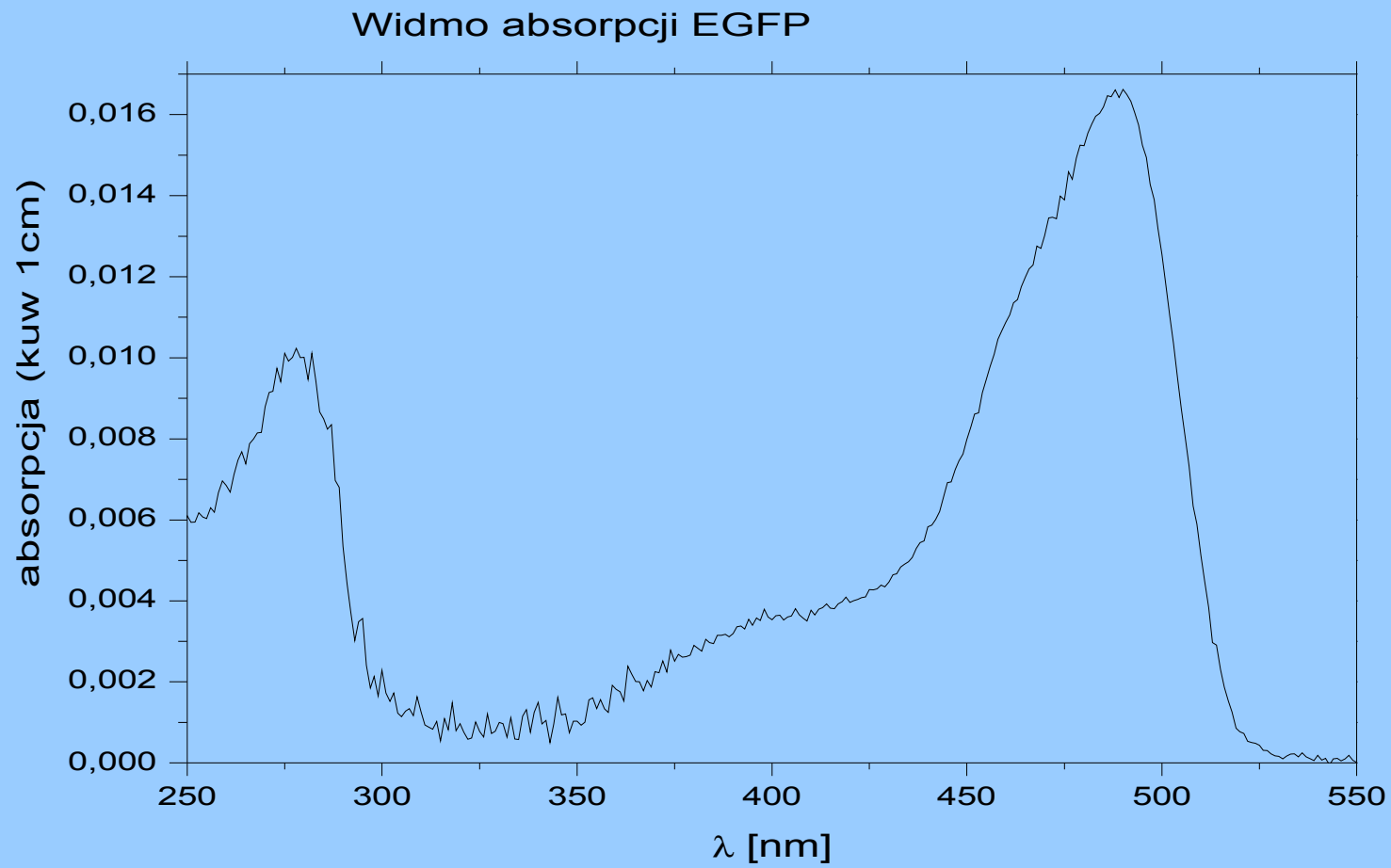
Diagram Jabłońskiego

Co absorbuje/świeci w białkach?

- ogólnie układ π - elektronowy (elektrony zdelokalizowane)
- w białkach:
 - ✓ aminokwasy aromatyczne: tryptofan i tyrozyna – absorpcja ok 280nm, emisja ok 340nm
 - ✓ chromofory niebiałkowe (np hem) i białkowe (GFP)*
 - ✓ wiązania peptydowe - absorpcja ok 220nm
 - ✓ mostki disiarczkowe (np w utlenionym DTT) – maksimum absorpcji 283nm (prawie pokrywa się z białkowym pikiem od Trp/Tyr)

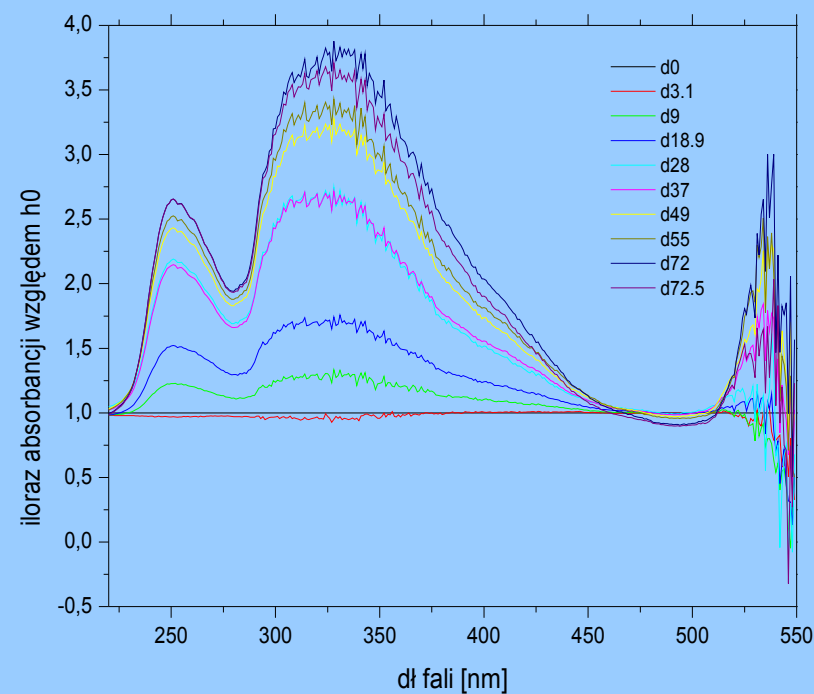
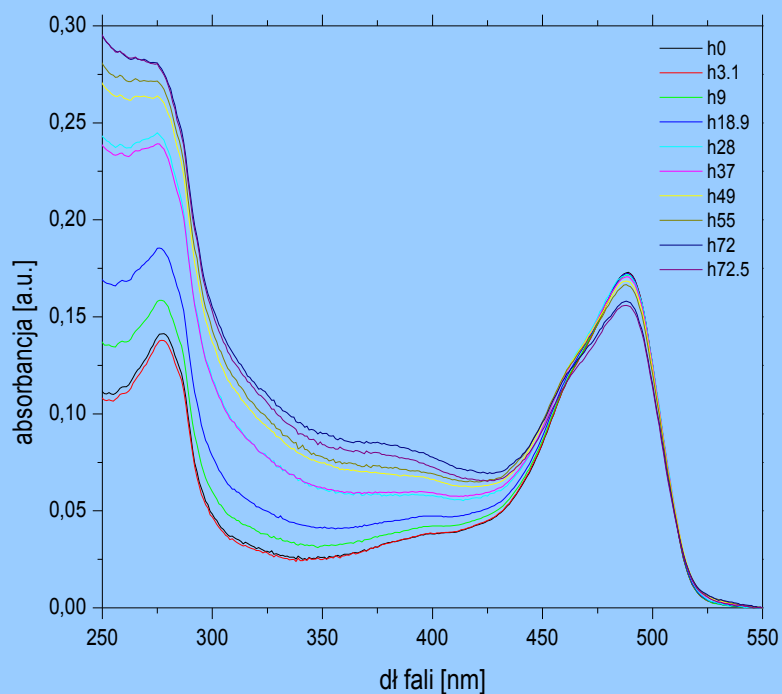
*chromofor jest generalnie strukturą zdolną do absorpcji promieniowania. Chromofory świecące to fluorofory

Jak wygląda widmo EGFP?

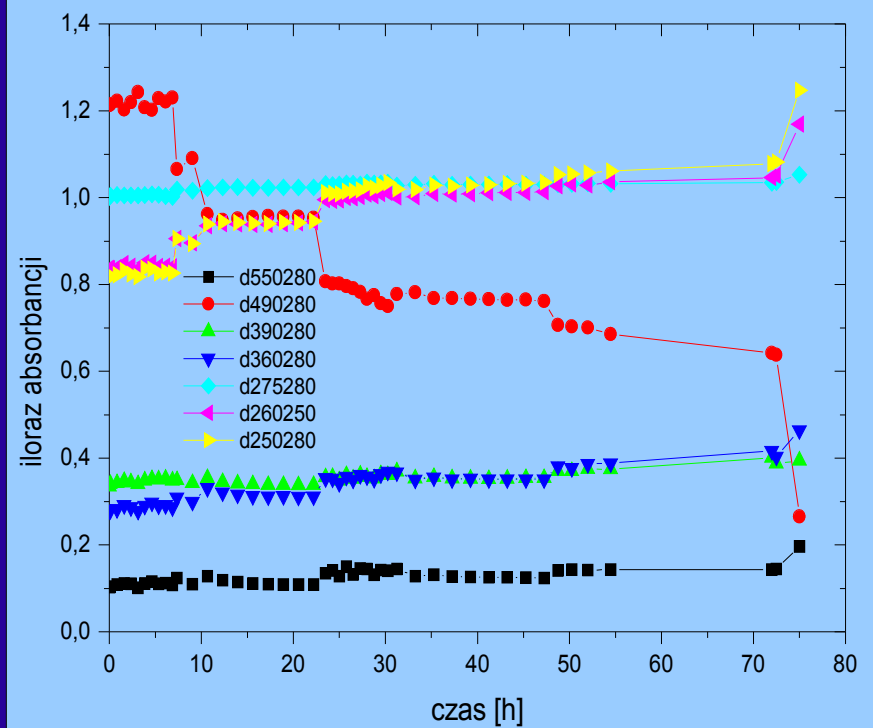
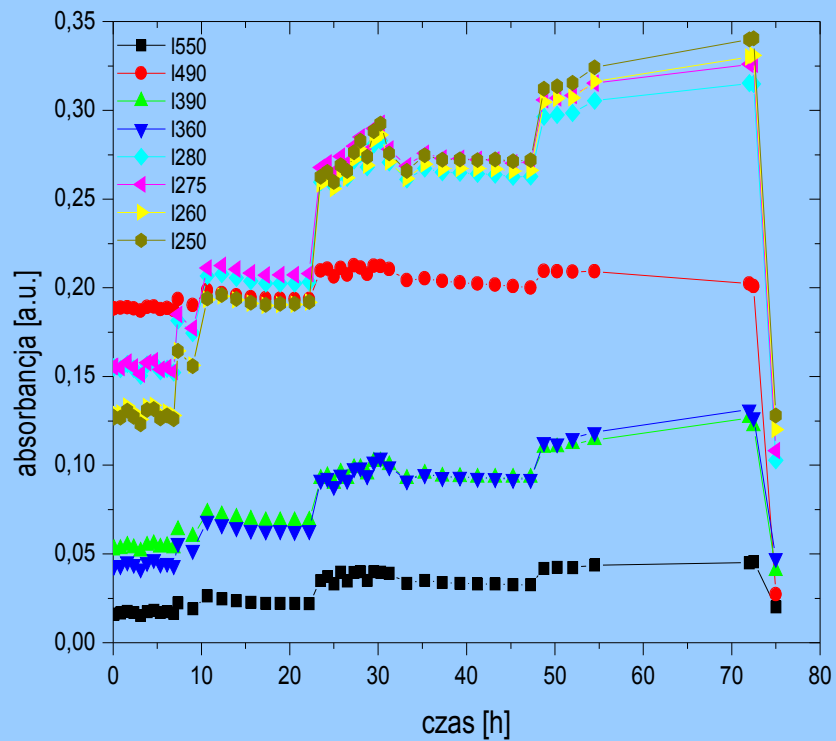


Agregacja EGFP

Widma absorpcji wykonywane co kilka godzin, odjęte tło buforu (50mM Pi 300mM NaCl, bez DTT)

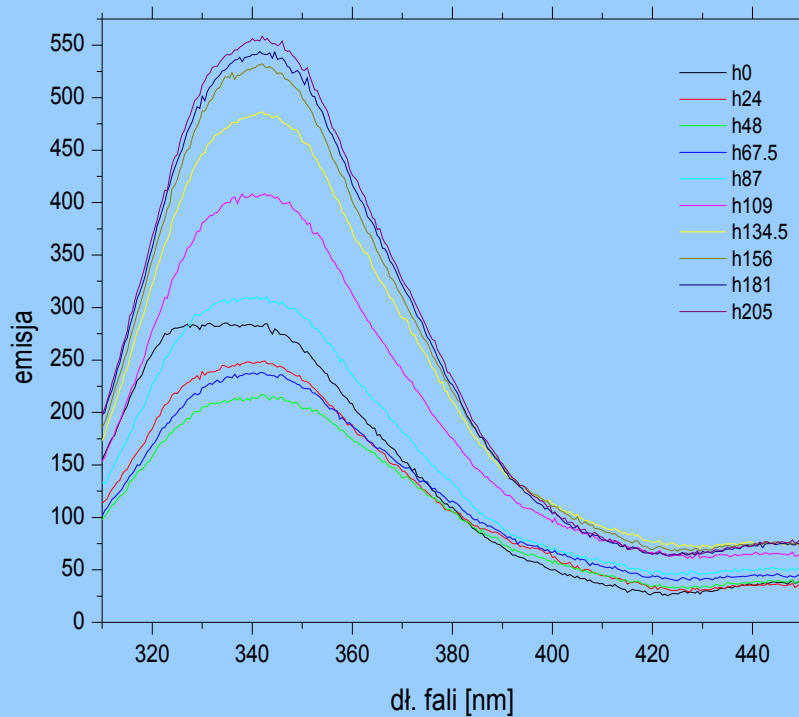


Agregacja EGFP

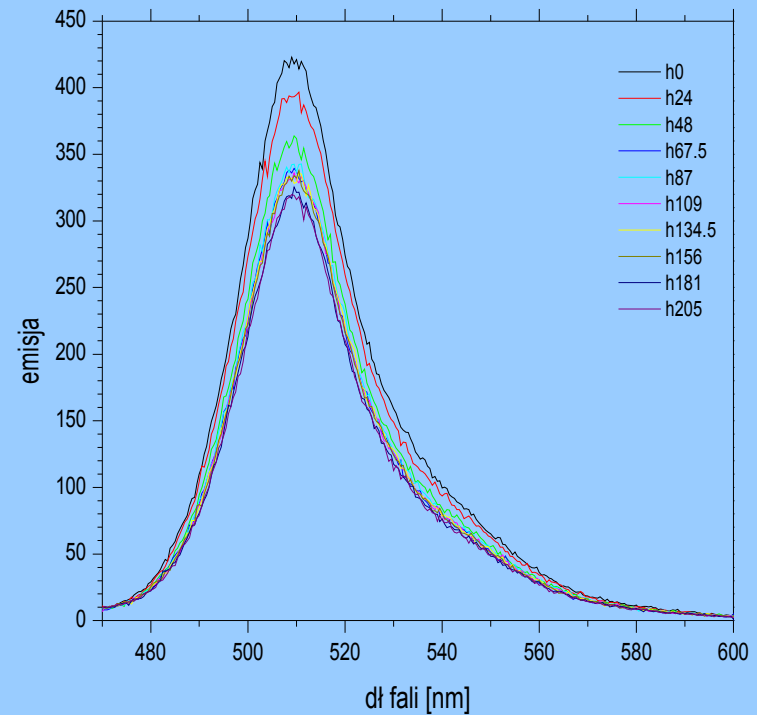


Zmiany emisji a agregacja

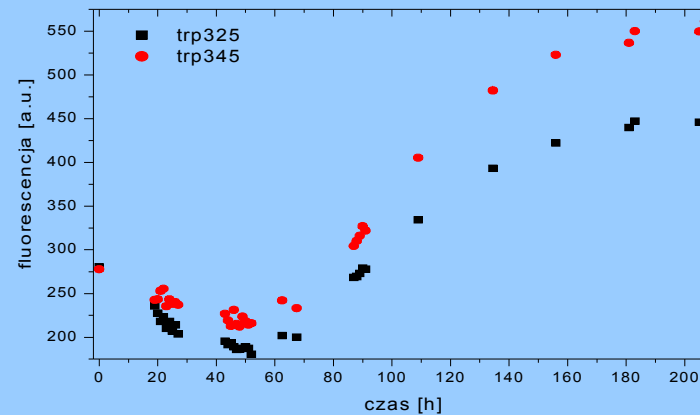
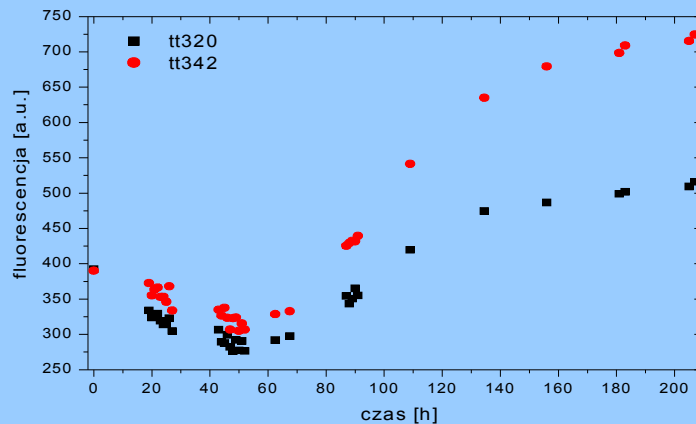
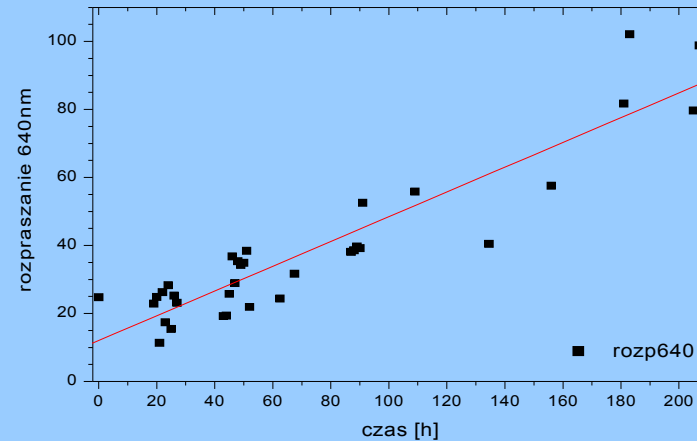
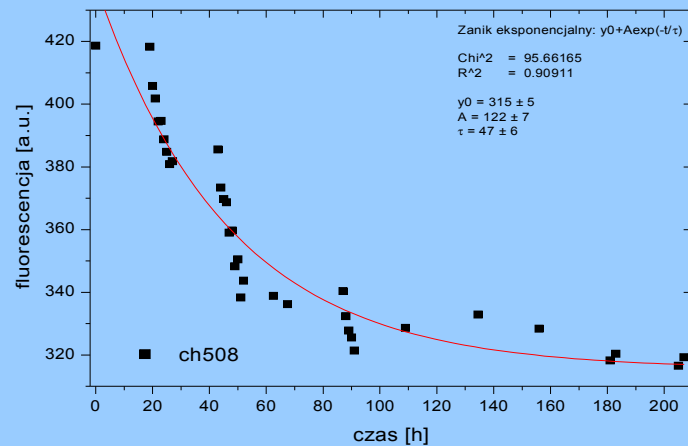
Ex 290nm



Ex 415nm



Zmiany emisji w czasie - agregacja



Denaturacja białek

Denaturacja nazywamy każdą zmianę struktury natywnej białka powodującą utratę aktywności biologicznej.

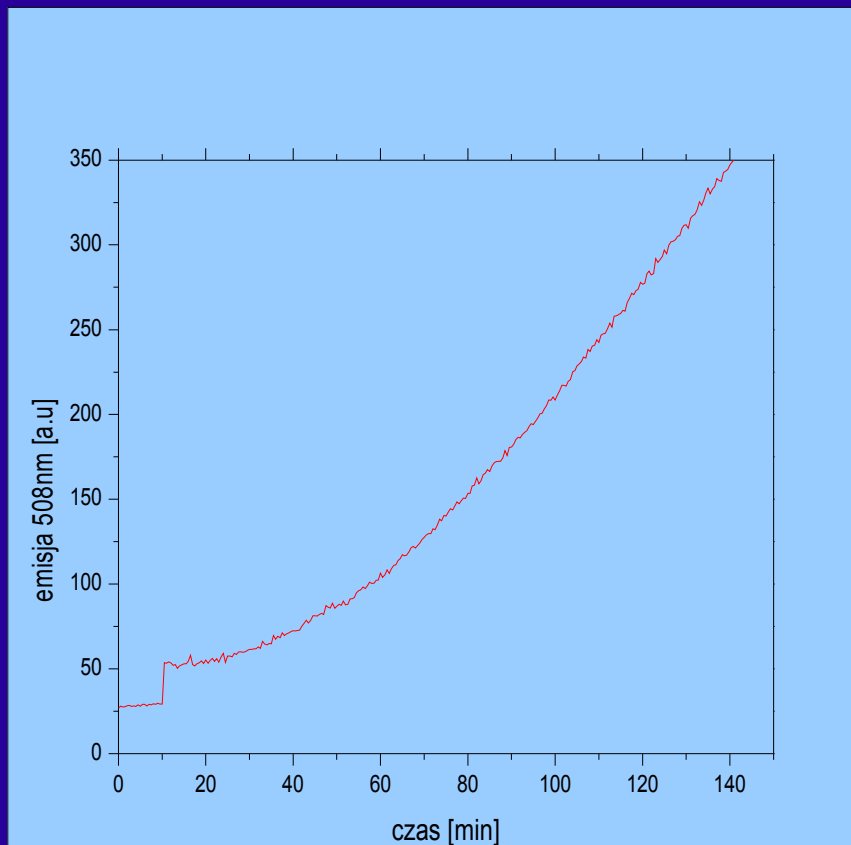
Denaturację mogą wywołać różne czynniki:

- środki chaotropowe (mocznik, hydrochlorek guanidyny $\text{H}_2\text{NC}(=\text{NH})\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$), działają w wysokich stężeniach
- detergenty (SDS – sodium dodecyl sulphate)
- ciepło
- odczynniki rozcinające mostki disiarczkowe (DTT – dithiotreitol, DTE – dithioerythritol)
- kwasy lub zasady ingerujące w mostki solne w białkach

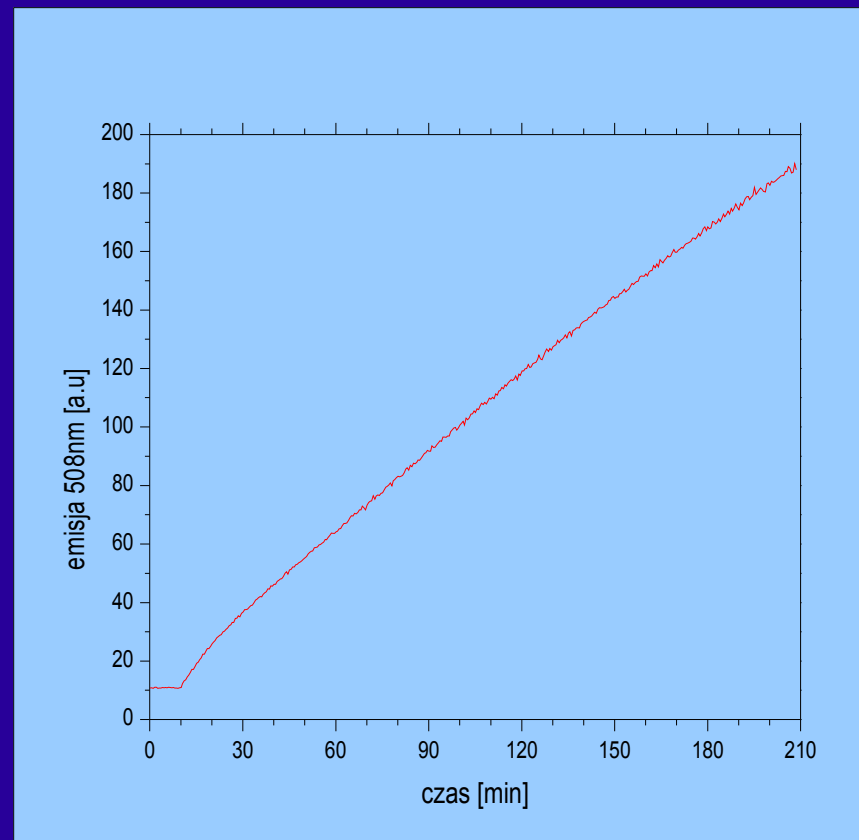
Chaotrope = chaos maker ; chaotropes break down the hydrogen-bonded network of water, so allowing macromolecules more structural freedom and encouraging protein extension and denaturation.

Zmiany emisji w czasie - zwijanie

S65T - GFP

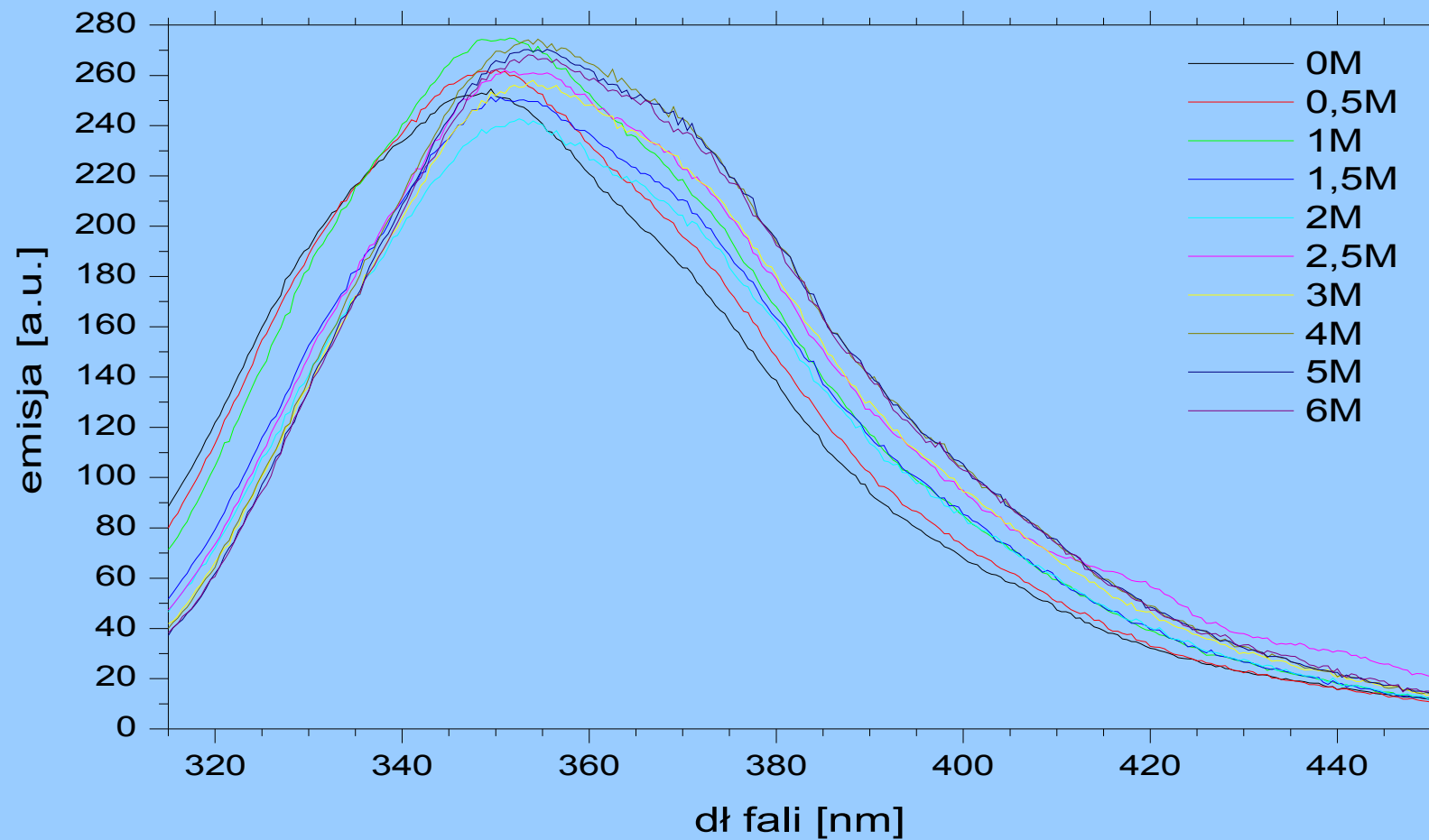


S65T/F64L - GFP

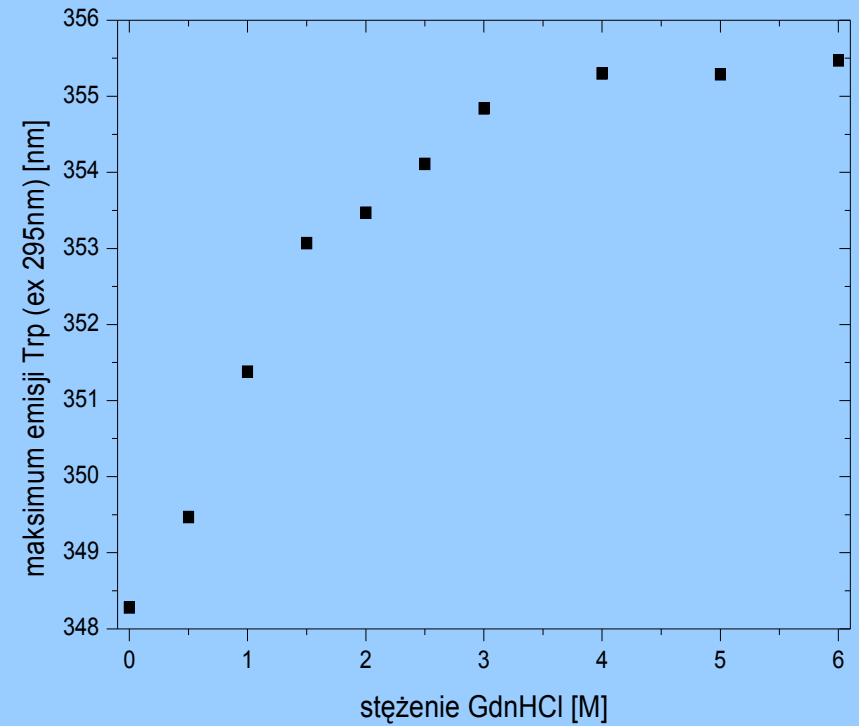
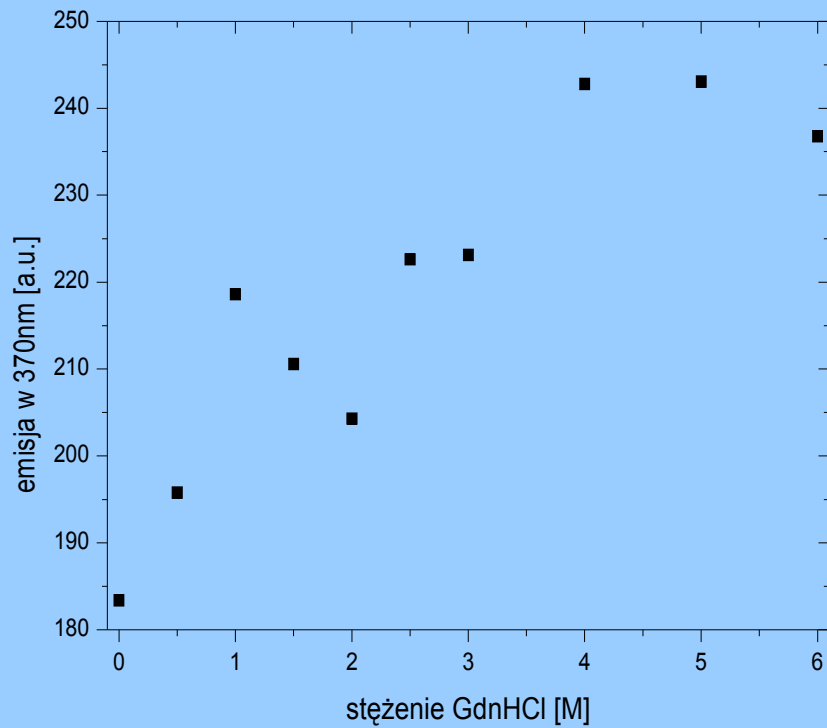


Ex 470nm em 508nm

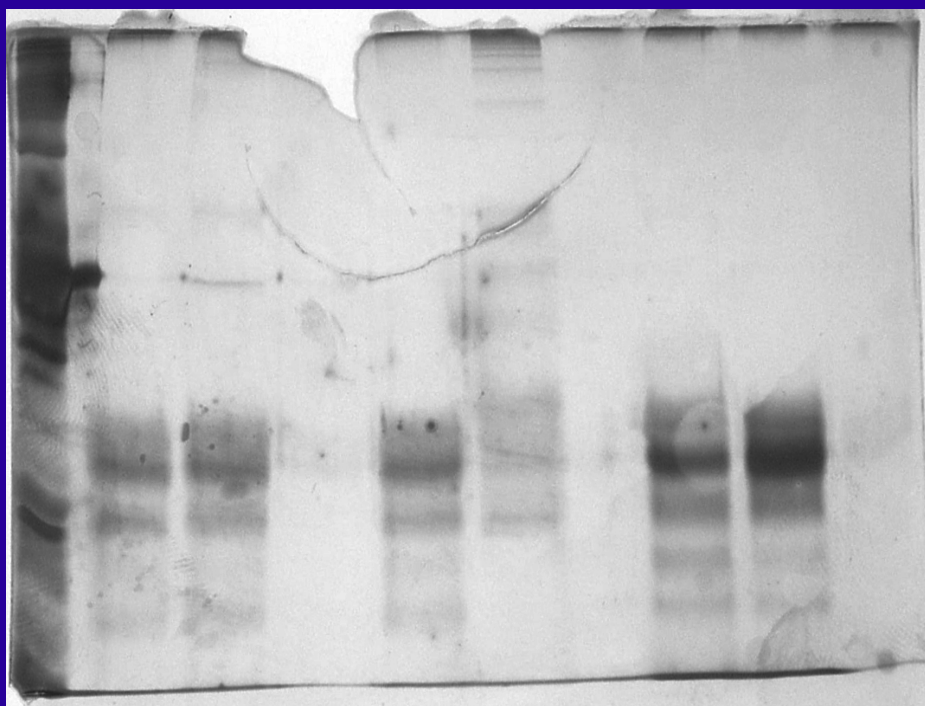
Zwijanie EGFP



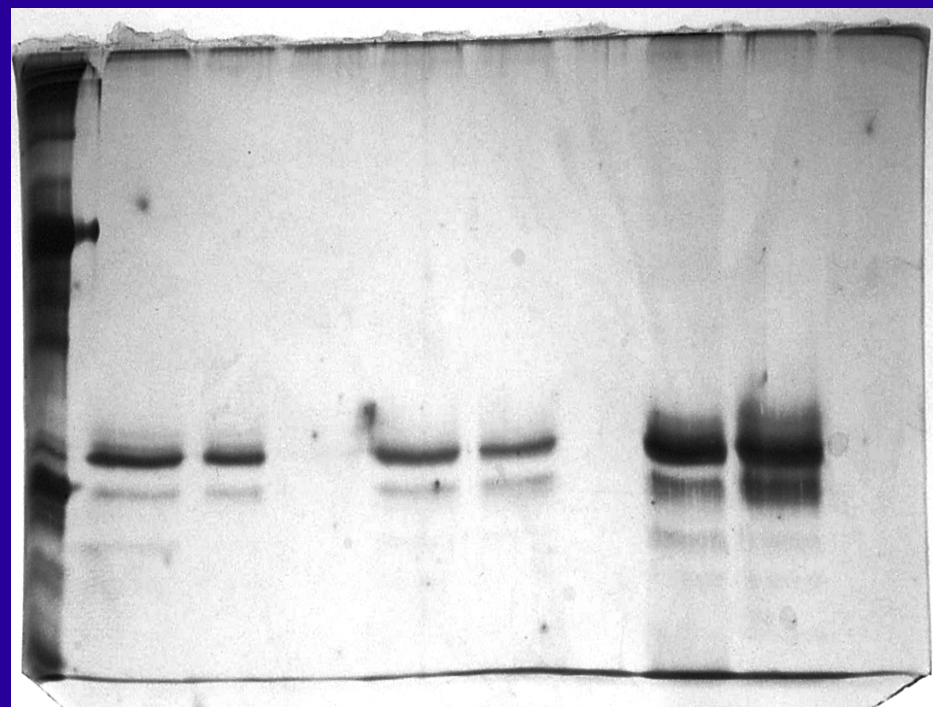
Zwijanie EGFP



Co wyszło na żelu?



bez β -merkaptetanolu



z β -merkaptotanołem

3 próbki: bez DTT, z DTT, ze świeżym DTT; stały 10 dni, zwirowane,
oddzielnie supernatant, oddzielnie pellet

Wnioski

- Nie wiadomo do końca czemu, ale EGFP agreguje ze stanu natywnego po rozcieńczeniu – stężona próbka jest stabilna. Agregację można zobrazować zarówno metodami absorpcyjnymi jak i emisyjnymi
- Inny jest mechanizm zwijania GFP i EGFP przy tym samym stężeniu białka w próbce i w tych samych warunkach.
- Elektroforeza – widać, że białko agreguje – prążki odpowiadające dimerom i trimerom; nie wiadomo co z wyższymi polimerami – trzeba zrobić żel z większymi porami.

Czeka mnie jeszcze dużo pracy!!!

My

Agnieszka Bzowska

Beata Kutrowska

Monika Olasek

Anna Buszko

Patricia Clark (University of Notre Dame,
USA)