

# VLASTNÍ FLUORESCENCE PROTEINŮ

Fluorescenční metody ve vědách o životě – cesta od molekuly k buňce

C7230

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních Biomolekul

FGP – Funkční genomika a proteomika

NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

MUNI  
SCI

Národní centrum  
pro výzkum  
biomolekul



<https://www.youtube.com/watch?v=vVWk-oz4Ffs>

# Příklady fluorescence živočichů



Co tam vlastně svítí?

# Fluorofory kolem nás

Fluorofory se dělí do dvou obecných tříd:

**Vnitřní (vlastní, intrinsic)** – vyskytují se přirozeně např. u proteinů.

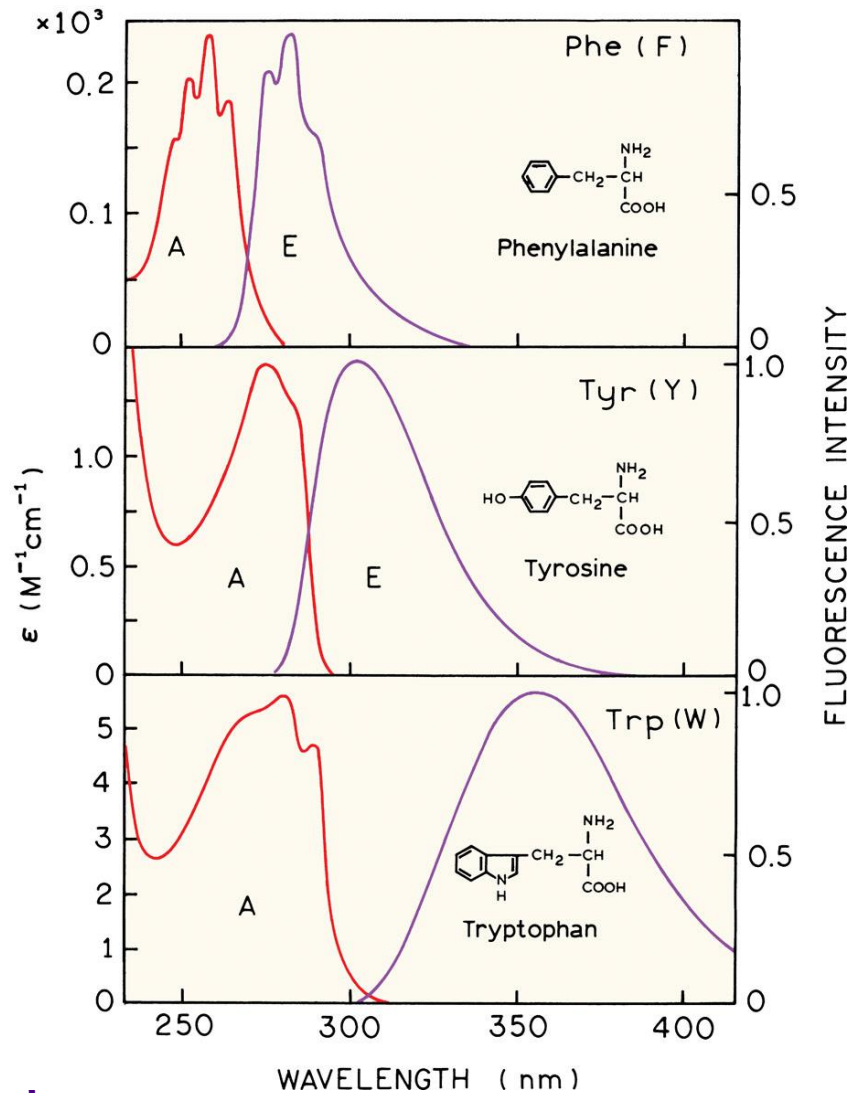
**Vnější (nevlastní, extrinsic)** – jsou přidány ke vzorkům, které nemají vhodné fluorescenční vlastnosti.

## Fluorescence proteinů

V proteinech jsou hlavními fluorofory aromatické aminokyseliny **tryptofan** (Trp), **tyrozin** (Tyr) a **fenylalanin** (Phe). Jejich absorpční pás leží mezi 240 a 300 nm, emise je rovněž v ultrafialové oblasti. Dominantním fluoroforem je tryptofan, resp. jeho indolová skupina, neboť má mnohem širší emisní spektrum než tyrozin, jehož fluorescenci umožňuje jeho fenolový kruh. Fenylalanin se na celkové fluorescenci bílkovin prakticky nepodílí.

Fluorescence tryptofanu je velmi citlivá na vlastnosti jeho okolí a lze ji proto použít pro sledování konformačních změn proteinů (např. při vazbě ligandů nebo při interakcích protein-protein).

# Absorpční a emisní spektra aromatických aminokyselin

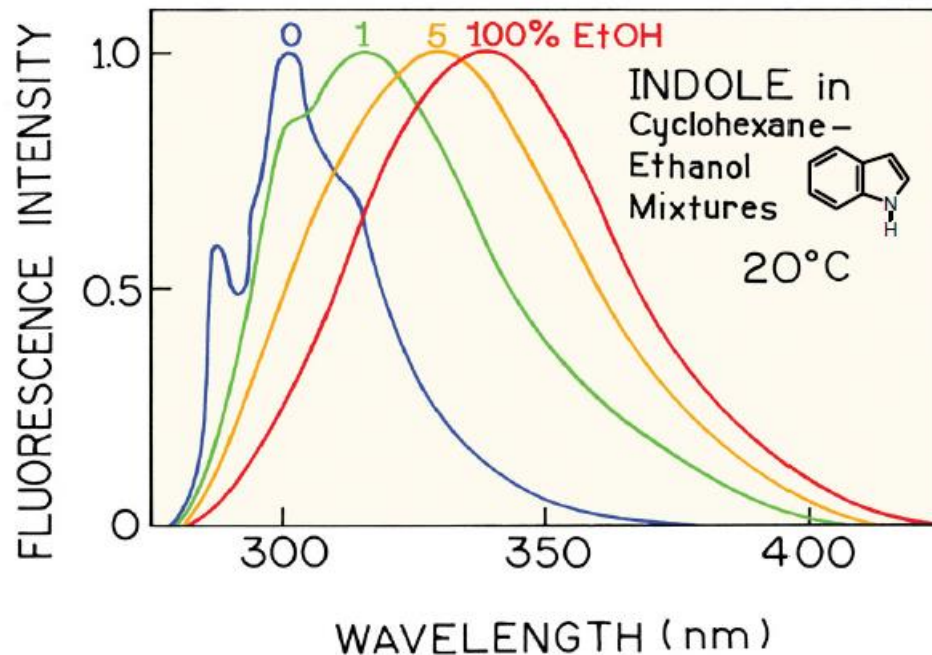


- Proteiny jsou fluorescenční díky třem aromatickým aminokyselinám: **tryptofanu, tyrozinu a fenylalaninu**.
- Vyskytují se v sekvenci relativně málo.
- Tryptofan (Trp) se vyskytuje jen asi v 1% mol, což je patrně dáno jeho poměrně metabolicky náročnou syntézou.
- Tryptofan je citlivý na lokální prostředí.

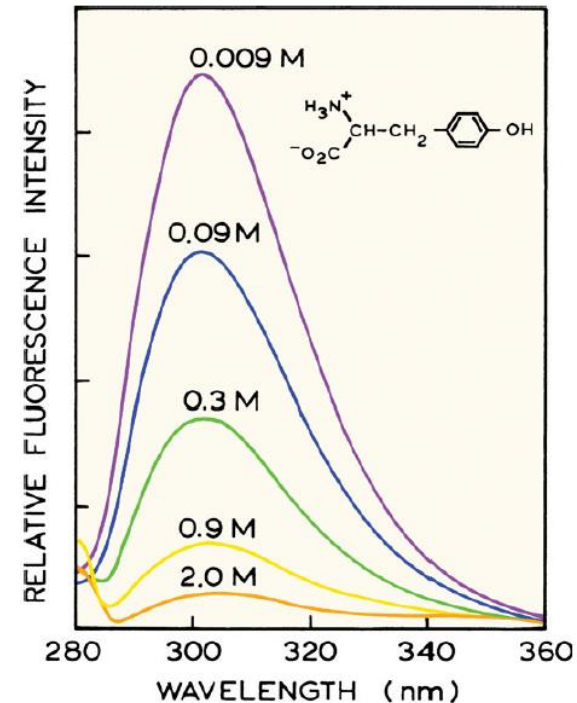
| fluorofor          | $\lambda_{ex}^{max}$ (nm) | $\lambda_{em}^{max}$ (nm) | kvantový výtěžek | doba života (ns) |
|--------------------|---------------------------|---------------------------|------------------|------------------|
| <b>tryptofan</b>   | 295                       | 353                       | 0,13             | 3,1              |
| <b>tyrozin</b>     | 275                       | 304                       | 0,14             | 3,6              |
| <b>fenylalanin</b> | 260                       | 282                       | 0,02             | 6,8              |

# Změna emisního spektra v závislosti na prostředí

## Polarita



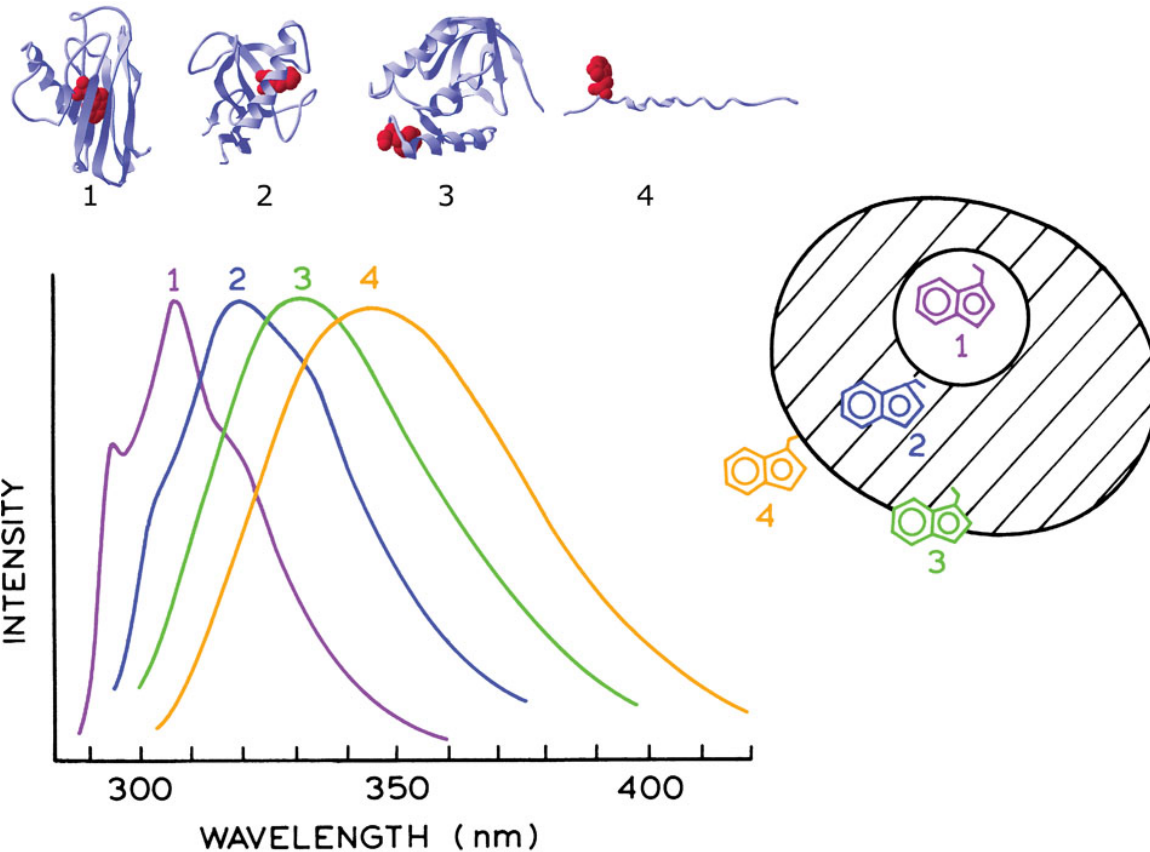
## Iontová síla



- Emise tryptofanu je ovlivněna okolním prostředím – lokálním elektrickým polem proteinu, polaritou rozpouštědla a iontovou silou roztoku.

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/solventeffects/index.html>

# Vliv okolního prostředí v proteinu na emisní spektrum tryptofanu



- 1 apoazurin PFI
- 2 ribonuclease T<sub>1</sub>
- 3 nukleáza stafylokoka
- 4 glukagon

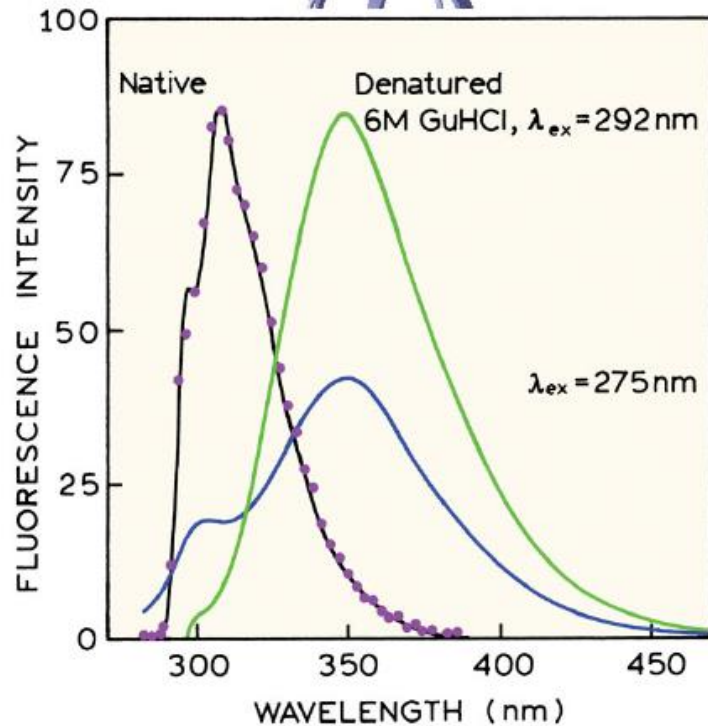
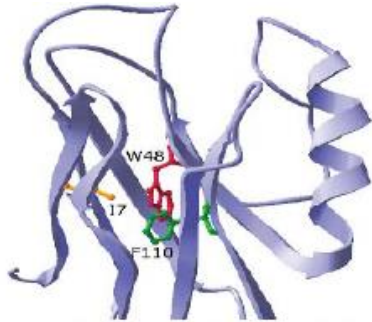
- Tryptofan má v nepolárním prostředí emisní maximum posunuto k nejkratší vln. délce (apoazurin).
- Tryptofan vystavený okolnímu polárnímu roztoku má maximum při nejdelší vln. délce (glukagon).

# Faktory ovlivňující emisi tryptofanu

- Zhášení přenosem protonu z blízkých aminoskupin.
- Zhášení elektronovými akceptory ( $\text{COO}^-$ ).
- Zhášení přenosem elektronu z disulfidů a amidů.
- Zhášení přenosem elektronu z peptidické vazby kostry proteinů.
- FRET mezi různými molekulami tryptofanu.

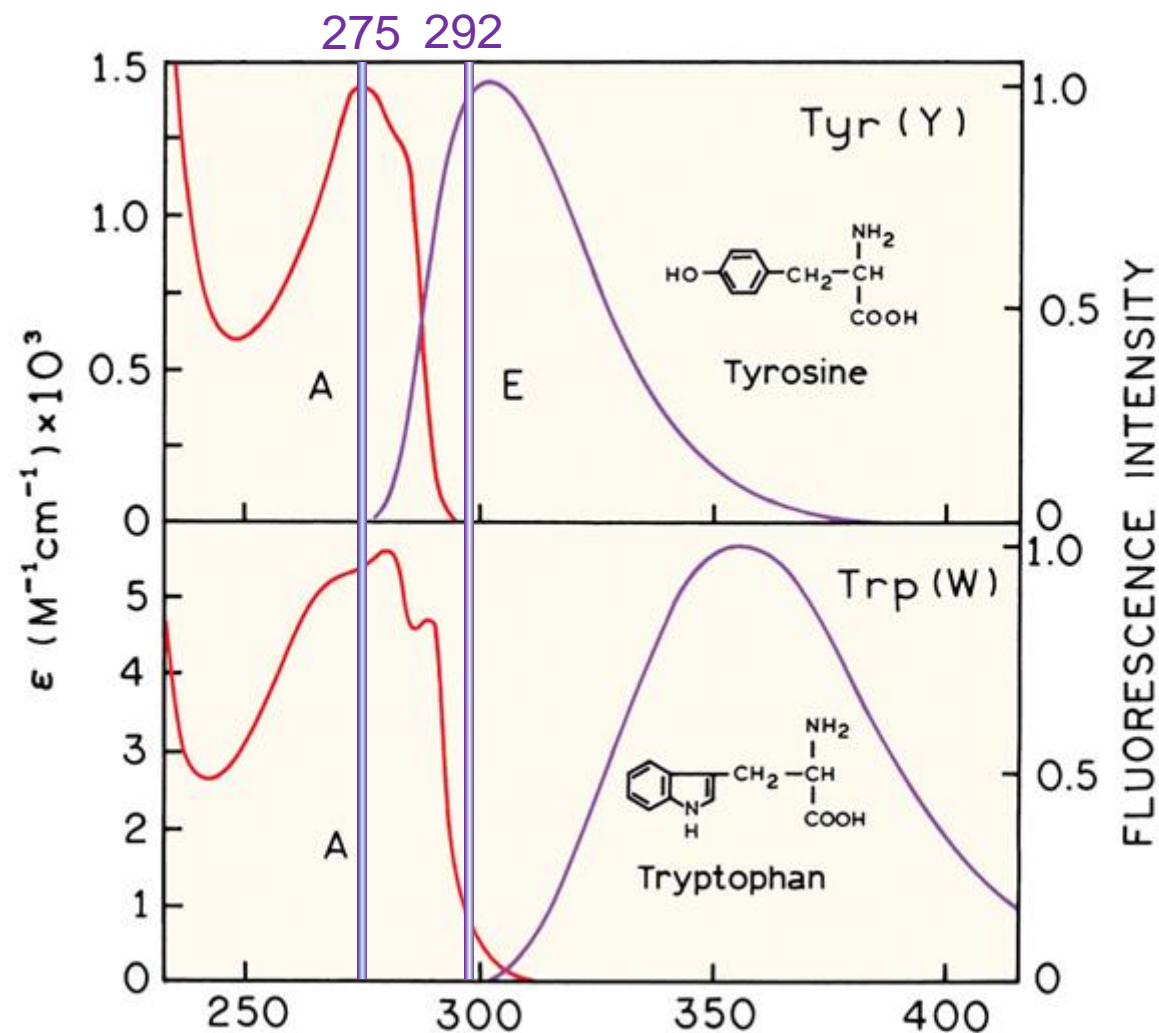


# Emise tryptofanu v nepolárním proteinovém prostředí - azurin

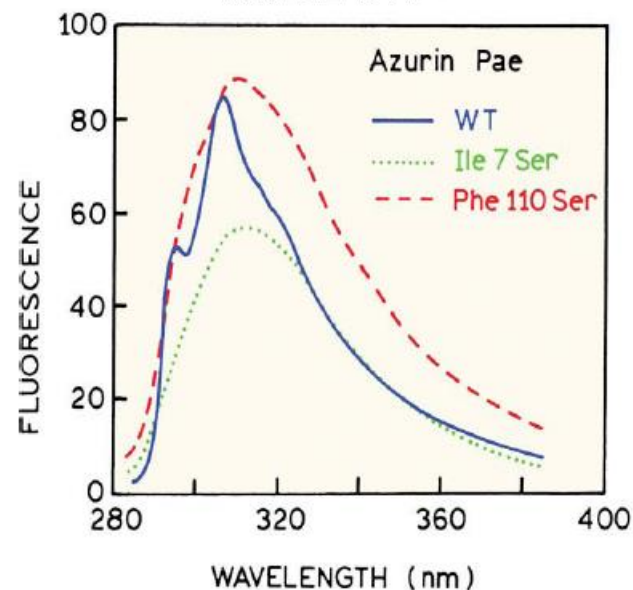
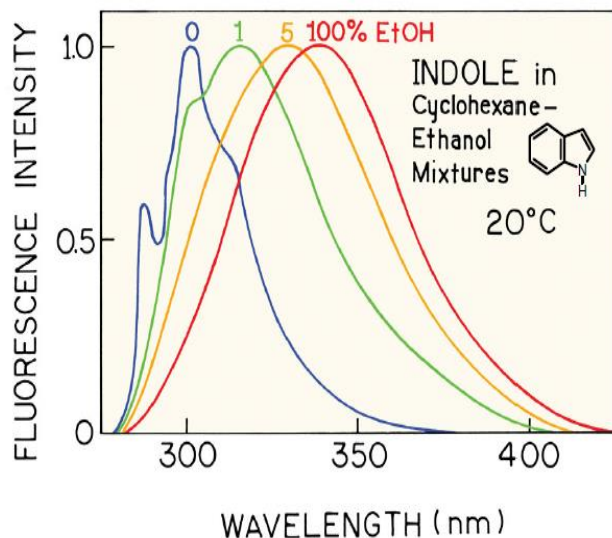


- Azurin z *Pseudomonas aeruginosa* je protein, který obsahuje měděný iont a podílí se na přenosu elektronů u denitrifikačních bakterií.
- Struktura je tvořena  $\alpha$ -šroubovicí a 8  $\beta$ -listy, které vytvářejí strukturu  $\beta$ -barel s velmi hydrofobním jádrem.
- V nativním stavu je emisní spektrum stejné jako v případě nepolárního prostředí (např. cyklohexan).
- V denaturovaném stavu se emisní spektrum posouvá, což odpovídá přechodu tryptofanu do polárního prostředí.
- Emisní spektrum je rozdílné při různé excitační vln. délce, protože při 275 nm se excituje také **tyrozin** (peak ~ 300nm), zatímco při 292 nm se excituje pouze **tryptofan**.

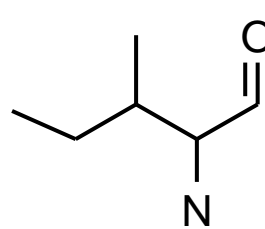
# Absorpční a emisní spektra aromatických aminokyselin



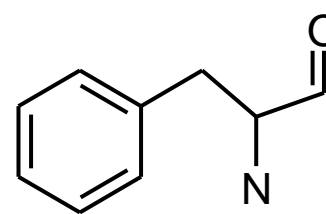
# Emise tryptofanu při záměně okolních aminokyselin



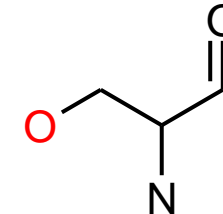
- Když cílená mutageneze azurinu nahradila nepolární isoleucin a fenilalanin za polární serin, došlo k posunu spektra k delším vlnovým délkám.
- Záměna za serin s OH skupinou vyvolala podobný efekt, jako by se Trp nacházel v etanolu.
- Již malá změna v okolí Trp vyvolala výrazný posun spektra.



isoleucin



fenylalanin



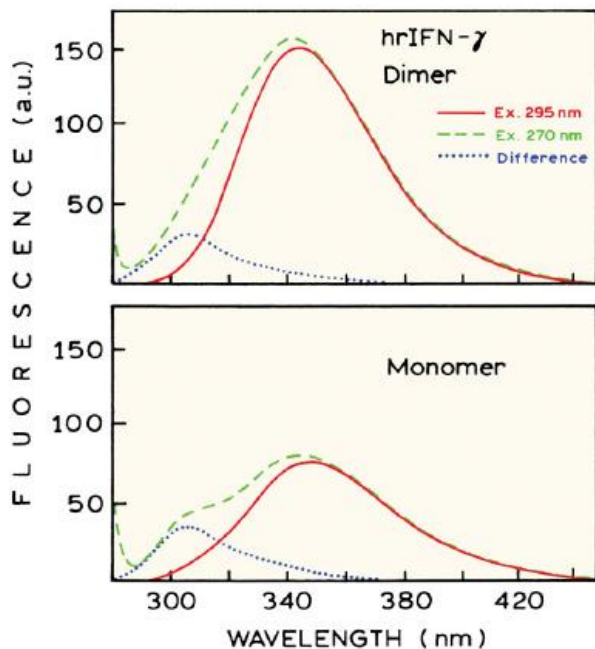
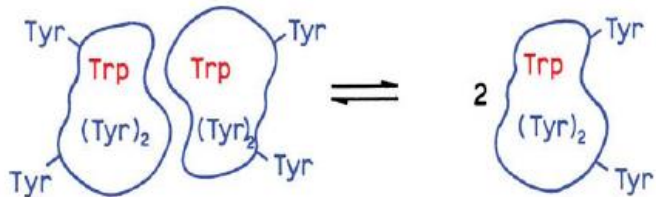
serin

# FRET mezi aminokyselinami

- Mezi různými aromatickými aminokyselinami dochází k rezonančnímu přenosu energie.
- FRET mezi tyrozinem a tryptofanem se vyskytuje nejčastěji, protože se nejčastěji vyskytují v sekvenci proteinů a oba jsou excitovány při 275nm.
- Míra přenosu energie je dána emisním spektrem a kvantovým výtěžkem aminokyseliny, která slouží jako donor.
- Míra přenosu energie je závislá na okolním prostředí jednotlivých AK.
- K rezonančnímu přenosu může docházet také mezi dvěma molekulami Trp v případě, že jedna je v nepolárním prostředí a druhá je vystavena do vnějšího prostředí (polární roztok).

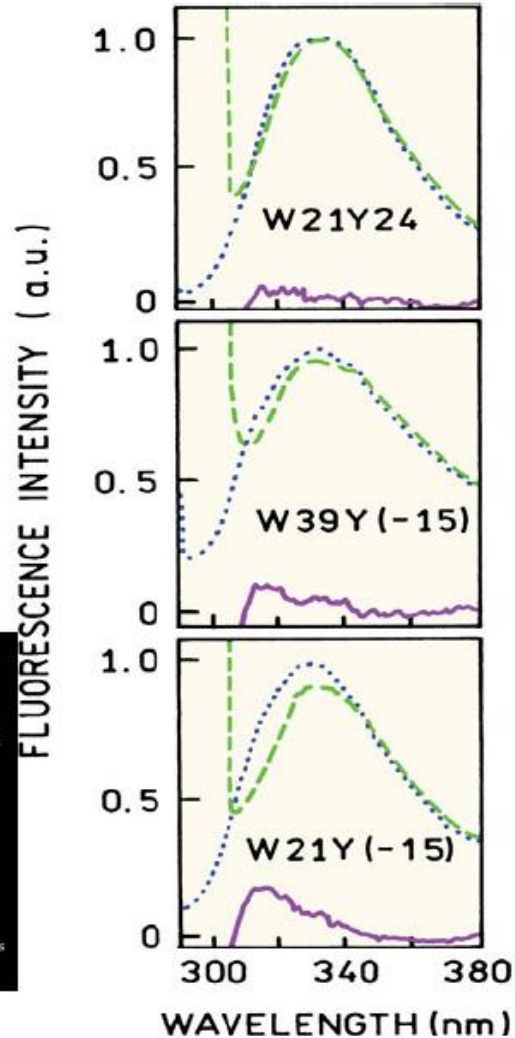
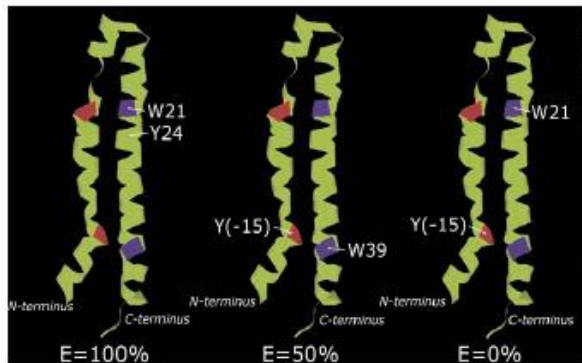
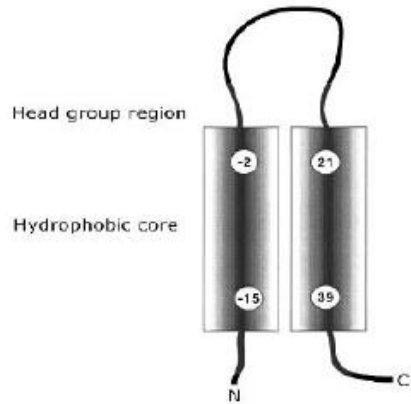
| Donor | Akceptor | $R_0$ (Å) |
|-------|----------|-----------|
| Phe   | Tyr      | 11-13     |
| Tyr   | Tyr      | 9-16      |
| Tyr   | Trp      | 9-18      |
| Trp   | Trp      | 4-16      |

# FRET mezi tyrozinem a tryptofanem u interferonu $\gamma$



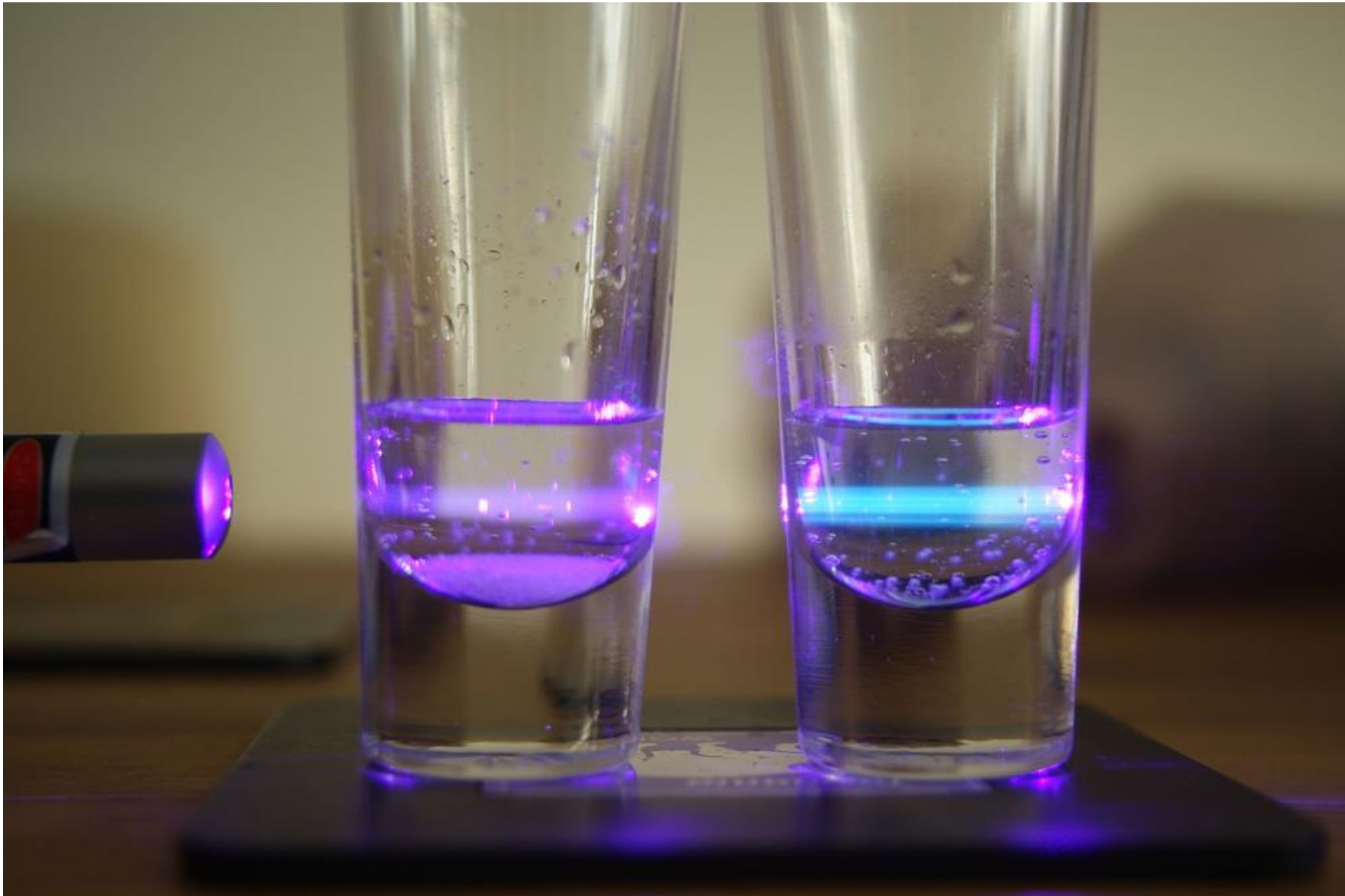
- Interferon  $\gamma$  je produkován aktivovanými lymfocyty a má antivirové a imunoregulační účinky.
- Aktivita interferonu je závislá na poměrném množství dimerů.
- Vlastní fluorescence interferonu, která je dána 4 tyroziny a tryptofanem, byla použita ke sledování disociace dimerů na monomery.
- Emisní spektrum dimeru při excitaci 270nm ukazuje, že se na fluorescenci podílí tryptofan i tyrozin.
- Při excitaci 295 nm je pozorována pouze emise tryptofanu.
- Rozdíl v emisních spektrech při excitaci 270 nm a 295 nm udává spektrum tyrozinu.
- V případě dimeru je relativní intenzita emise tyrozinu 20 % ve srovnání s emisí tryptofanu.
- V případě monomeru je relativní intenzita emise tyrozinu 50 % ve srovnání s intenzitou tryptofanu.
- Zvýšení rel. intenzity tyrosinu po disociaci je dáno oddálením tryptofanů (akceptorů FRET), které byly v dimeru v těsné blízkosti tyrozinů.
- Snížení přenosu energie mezi tryptofanem a tyrozinem ukázalo, že při disociaci dochází k oddálení čtyř „vnějších“ tyrozinových zbytků od tryptofanů.

# Využití FRET mezi aminokyselinami k určení prostorového uspořádání



- Membránový protein M13 je zanořen do membrány *E. coli* při připojení fágové částice.
- Bylo navrženo, že dvě  $\alpha$ -šroubovice tohoto proteinu jsou v membráně v těsné blízkosti.
- Cílenou mutagenezí byly vytvořeny varianty proteinu, které obsahovaly tyrozin a tryptofan (donor–akceptor FRET) v různých pozicích.
- Ponechán vždy pouze jeden pár tyrozin – tryptofan.
- Byla sledována emise fluorescence při excitaci 280 (---) a 295 nm (...) a z rozdílu byla určena emise tyrozinu.
- V případě, kdy je vzdálenost tyrozinu a tryptofanu větší, je intenzita emise tyrozinu větší.
- Když jsou tyrozin a tryptofan v těsné blízkosti dochází k FRET, což výrazně snižuje emisi tyrozinu.
- Snížení intenzity emise tyrozinu v případě W39Y(-15) prokázalo těsné uspořádání  $\alpha$ -šroubovic.

# Zhášecí experiment



# Zhášení fluorescence

- **Zhášení fluorescence** lze definovat jako bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence (tzn. intenzitu fluorescence) beze změny fluorescenčního emisního spektra. Může být důsledkem různých procesů.
- **Srážkové (dynamické) zhášení** nastává, když je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován (tj. navrací se nezářivě do základního stavu) při srážce s molekulou zhášedla. Molekuly nejsou při tomto procesu chemicky změněny na rozdíl od
- **statického zhášení**, kdy se po kontaktu fluoroforu a zhášedla vytváří **nefluorescenční komplex**.
- **Samozhášení** je zhášení fluoroforu jím samotným; nastává při jeho vysokých koncentracích nebo při vysoké hustotě značení.



# Dynamické zhášení

- Snížení intenzity fluorescence dynamickým zhášením je popsáno **Sternovou-Volmerovou rovnicí**:

$$F_0/F = \tau_0/\tau = 1 + k_q \tau_0 C_q$$

$F_0$  – kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhášedla,

$F$  – totéž za přítomnosti zhášedla o koncentraci  $C_q$ ,

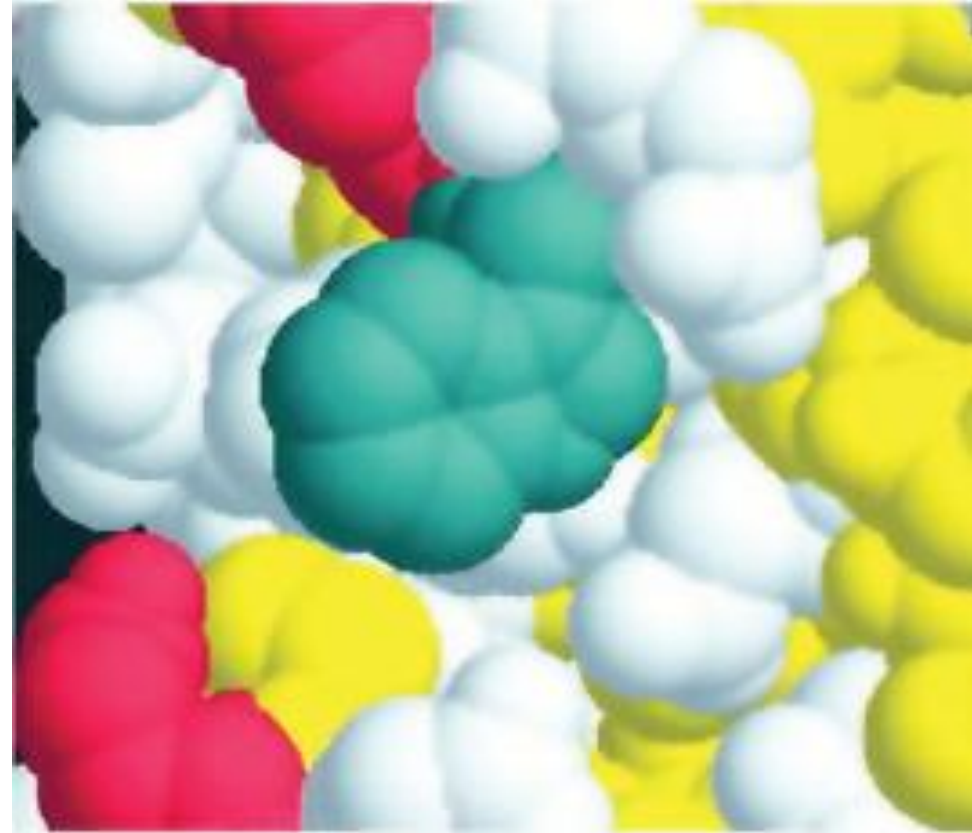
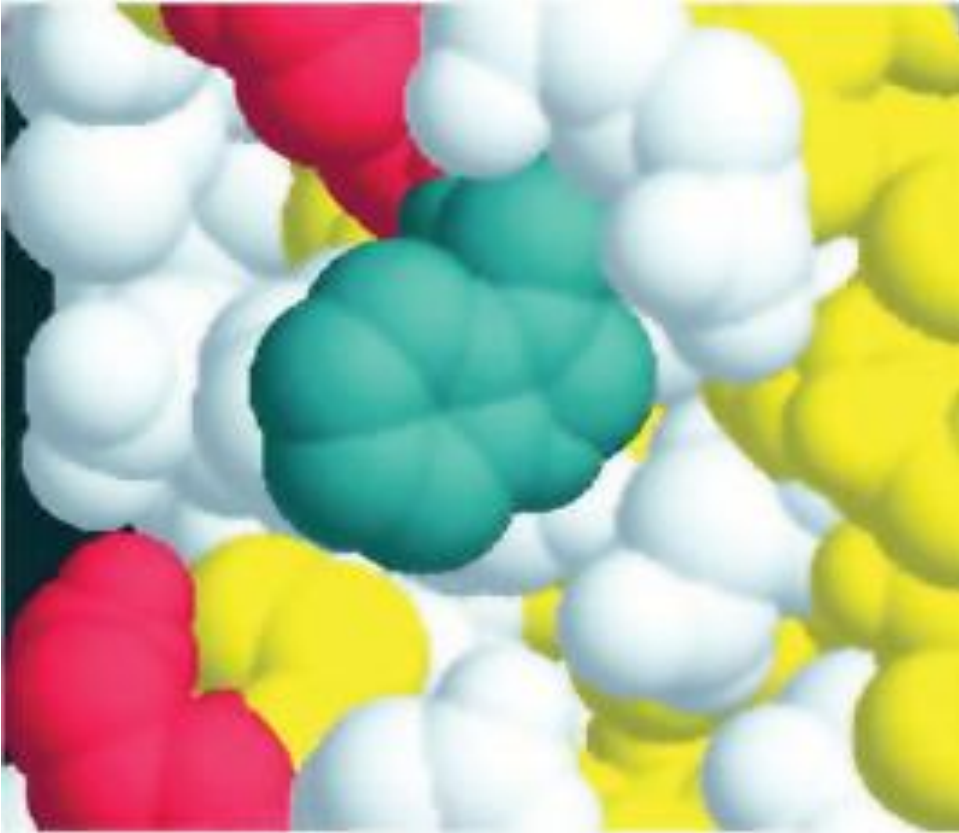
$\tau_0$  – doba dohasínání fluorescence bez zhášedla,

$\tau$  - doba dohasínání v přítomnosti zhášedla,

$k_q$  – bimolekulární zhášecí konstanta (= bimolekulární rychlostní konstanta určená difúzí vynásobená účinností zhášení).

- Hodnota  $k_q$  udává koncentraci zhášedla, při které se sníží intenzita fluorescence na polovinu.
- Nejčastějším dynamickým – kontaktním zhášedlem fluorescence i fosforescence je molekulární **kyslík** ( $O_2$ ). Dále fluorescenci zhášejí (v důsledku mezisystémové konverze) atomy halogenů jako je **bróm** a **jód**. Často používaným zhášedlem je také **akrylamid**.

# Jak to, že se kyslík dostane i do vnitřních oblastí proteinů?



- Je malý a proteiny „dýchají“

# Statické zhášení

- Vytváří se komplex fluoroforu a zhášedla, který již nefluoreskuje.
- Platí pro něj také Sternova-Volmerova rovnice:

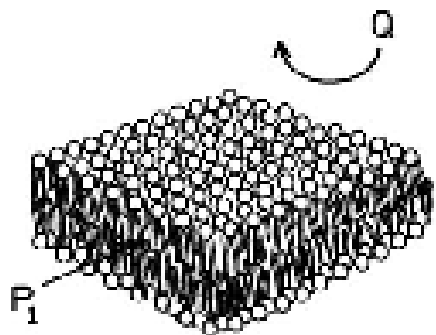
$$F_0/F = 1 + K_a \tau_0 C_q$$

Kde  $K_a$  je asociační konstanta fluoroforu a zhášedla.

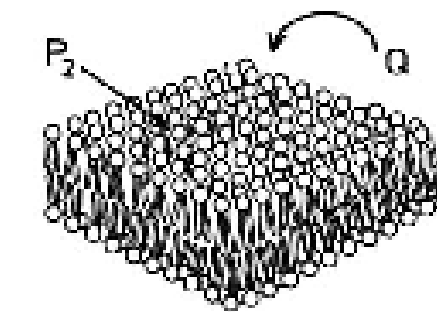
Typickými statickými zhášedly jsou:

- Báze nukleových kyselin (hlavně Guanin)
- Nikotinamid
- Těžké kovy

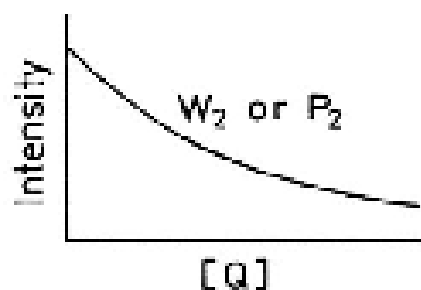
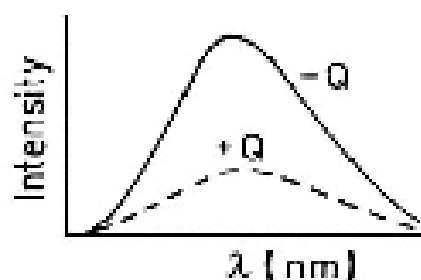
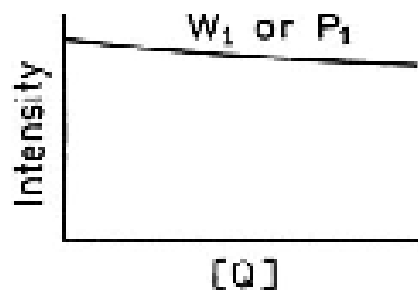
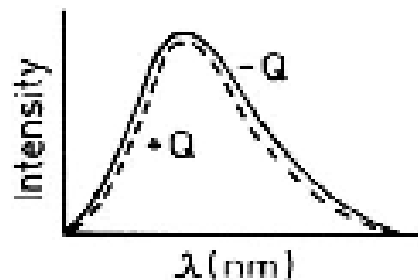
# Využití zhášení při lokalizaci fluoroforu



Zanořen v membráně



Vystaven na povrchu



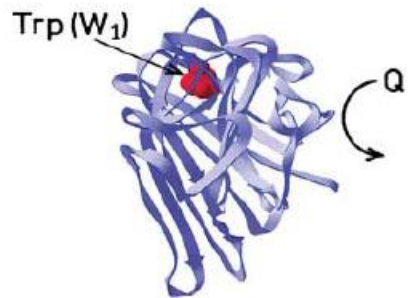
## V membráně

- Jestliže je fluorofor P1 zanořen v membráně, je pro zhášedlo Q nedostupný a ke zhášení téměř nedochází.
- S rostoucí koncentrací zhášedla se intenzita fluorescence téměř nemění.

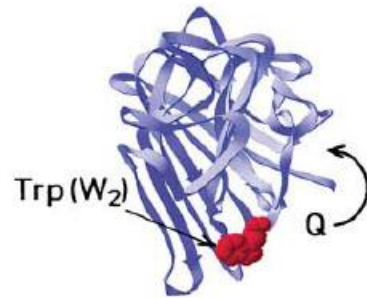
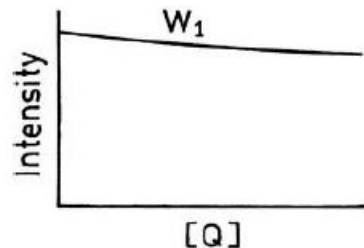
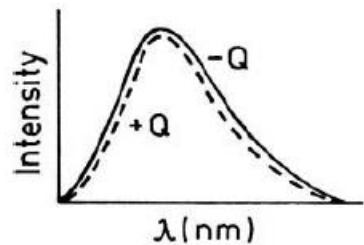
## Na povrchu

- Jestliže je fluorofor P2 na povrchu, dochází k účinnému zhášení.
- S rostoucí koncentrací zhášedla intenzita fluorescence velmi výrazně klesá.

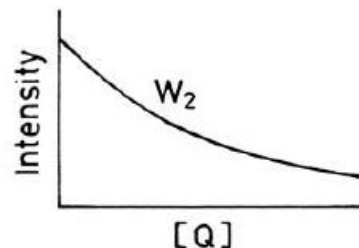
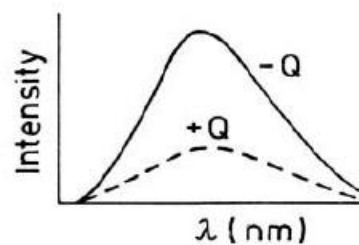
# Zhášení při studiu struktury proteinů aneb je tryptofan na povrchu proteinu?



Buried Tryptophan

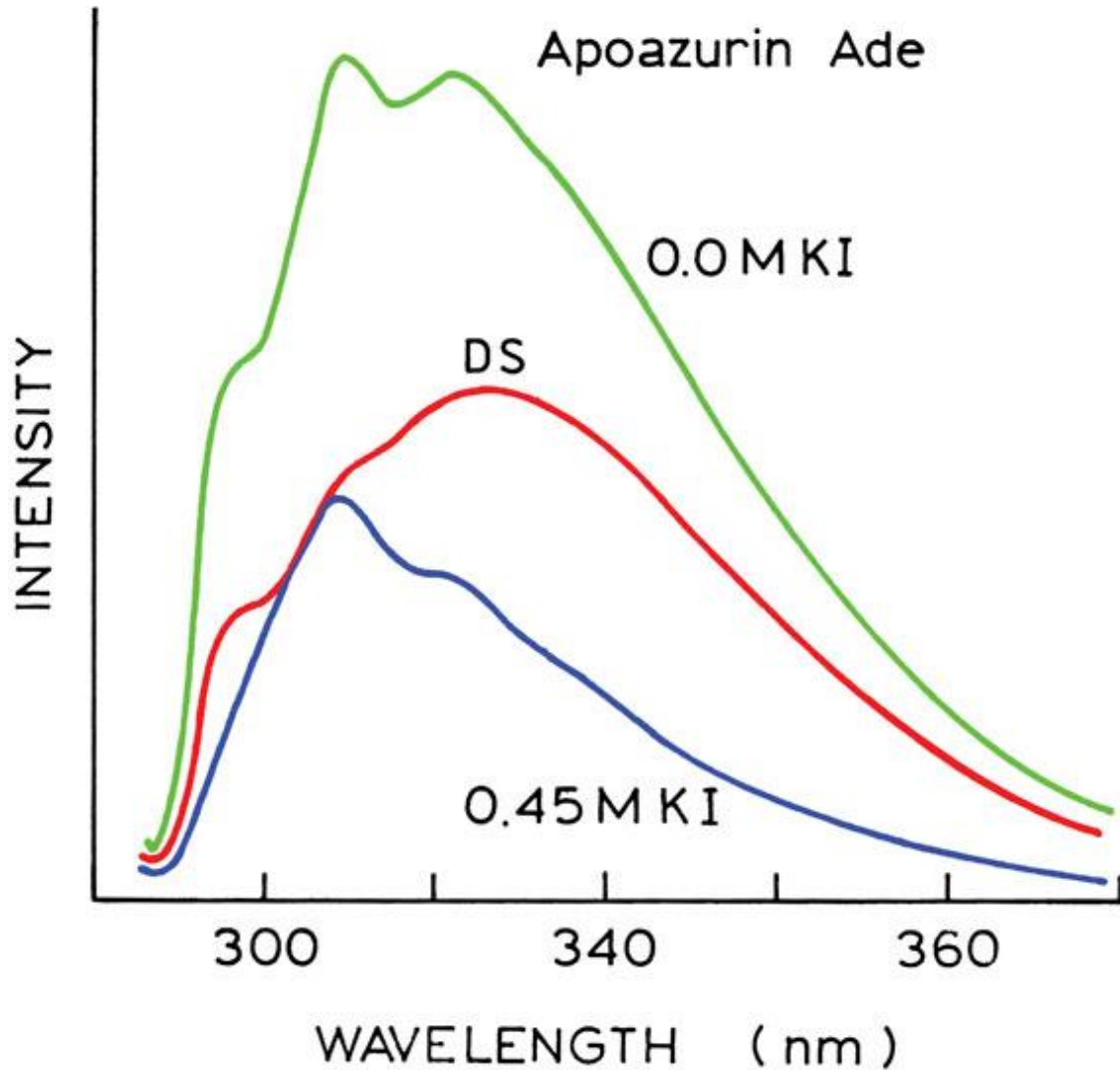


Surface Tryptophan



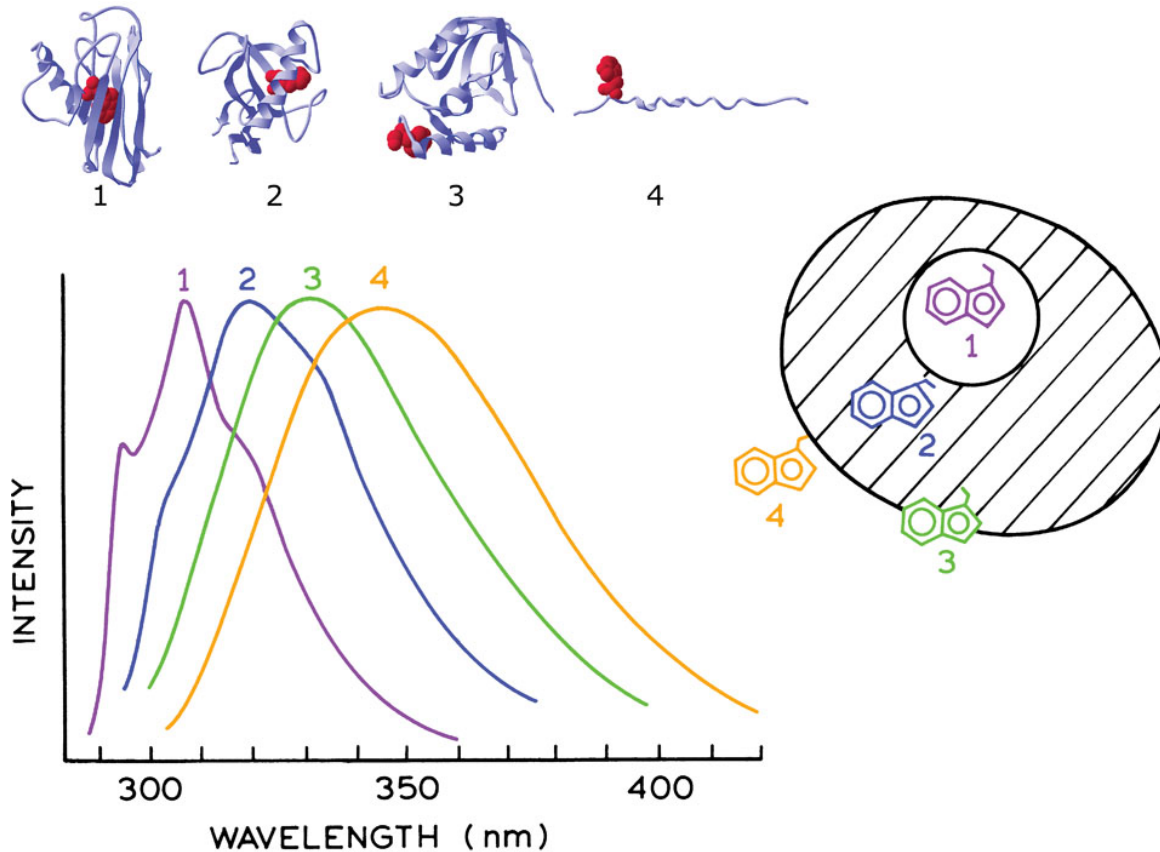
- Dynamické zhášení vyžaduje přímý kontakt fluoroforu a zhášedla.
- Když je tryptofan umístěn „uvnitř“ proteinu, nedochází k jeho zhášení (W1).
- Když je tryptofan umístěn na povrchu proteinu, ke zhášení dochází (W2).

# Zhášení při studiu apoazurinu



- Apoazurin má v sekvenci dva tryptofany.
- Jeden tryptofan je na povrchu, druhý zanořený.
- Po přidání zhašedla (KI) do roztoku dojde ke zhášení povrchového tryptofanu.
- DS je diferenční spektrum.

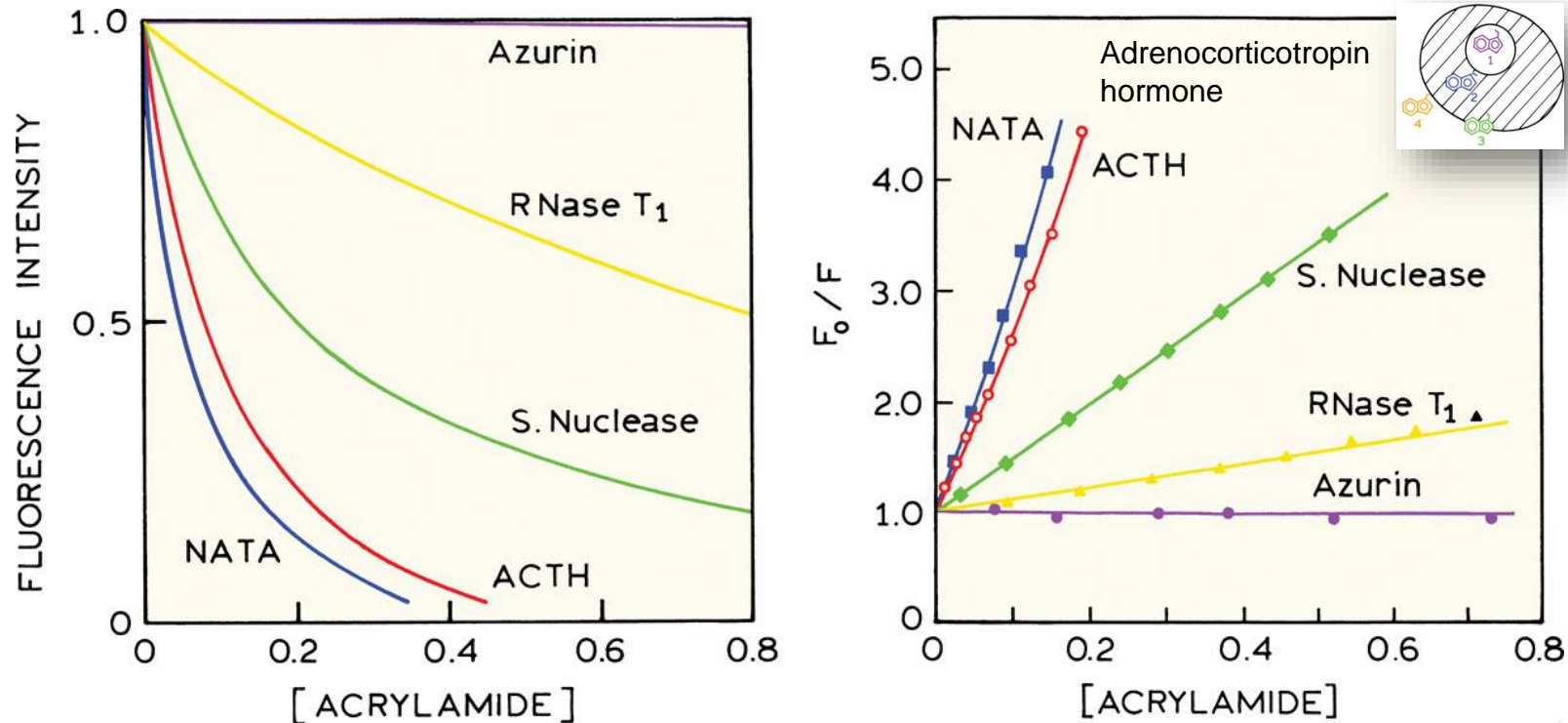
# Vliv okolního prostředí v proteinu na emisní spektrum tryptofanu



- 1 apoazurin PFI
- 2 ribonuclease T<sub>1</sub>
- 3 nukleáza stafylokoka
- 4 glukagon

- Tryptofan má v nepolárním prostředí emisní maximum posunuto k nejkratší vln. délce (apoazurin).
- Tryptofan vystavený okolnímu polárnímu roztoku má maximum při nejdelší vln. délce (glukagon).

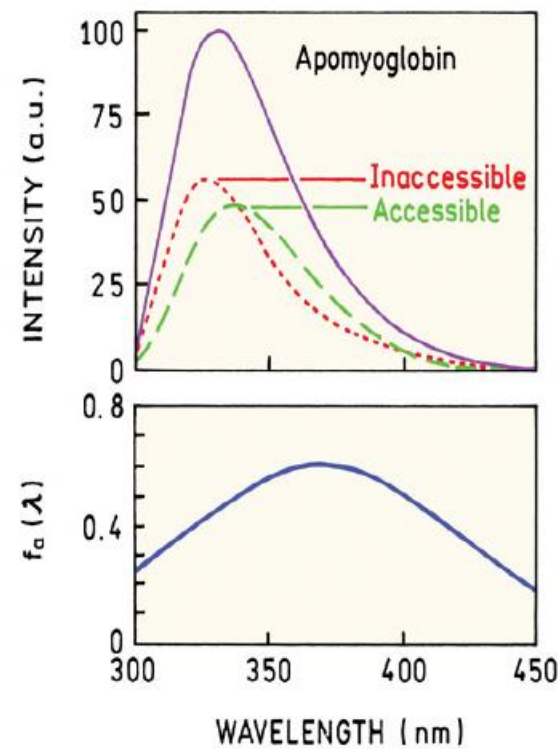
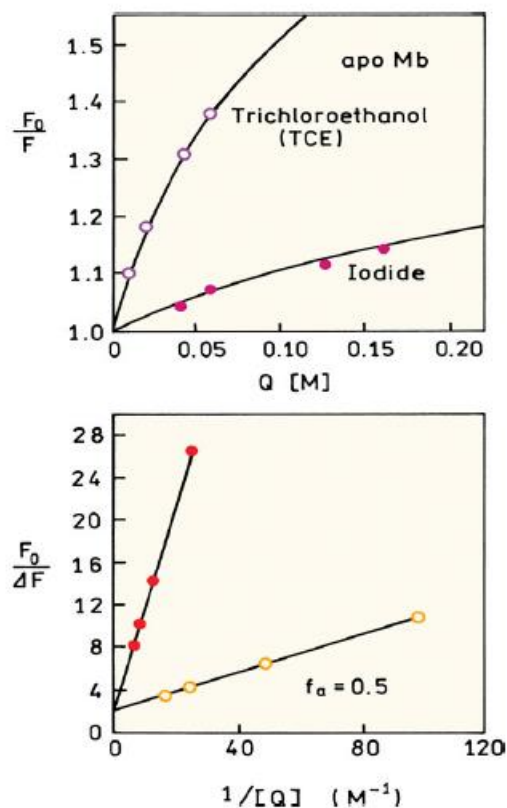
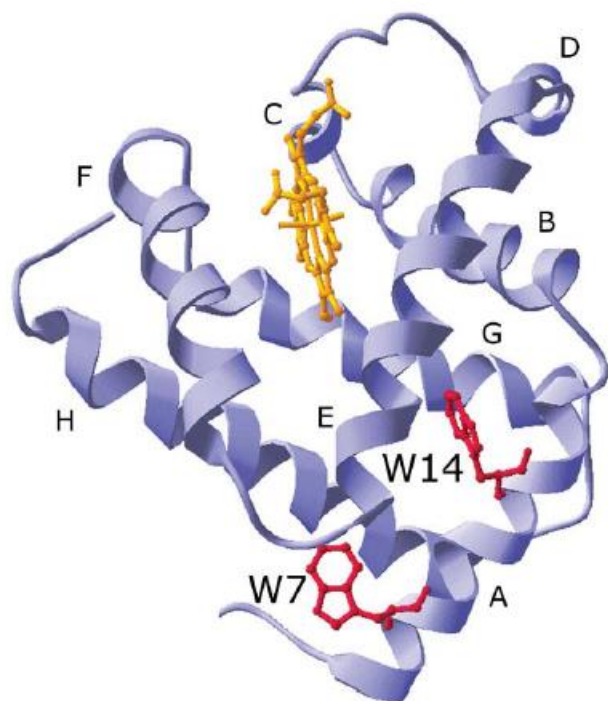
# Zhášení proteinů s jedním tryptofanem roztokem akrylamidu



- Čím je sklon Stern-Volmerova grafu větší, tím větší je míra zhášení.
- Nejlépe je zhášen tryptofan, který je volně v roztoku (reprezentován NATA- N-acetyl-L-tryptophanamide).
- Nejméně dostupným pro zhášedlo je tryptofan v azurinu.




# Zhášení 2 tryptofanů v myoglobinu



- Při zhášení tryptofanů u koňského myoglobinu (obsahuje 2 Trp) bylo zjištěno, že poměrná polovina intenzity je zhášena.
- To vedlo k potvrzení, že tryptofan W14 je umístěn ve vnitřní části struktury mezi  $\alpha$ -šroubovicemi, zatímco W7 je na povrchu proteinu.

# Odvození upravené rovnice

$$f_a = \frac{F_{0a}}{F_{0a} + F_{0b}} = \frac{F_{0a}}{F_0}$$


$$F_0 = \frac{F_{0a}}{f_a} \quad F_0 = F_{0a} + F_{0b}$$

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K_a[Q]} + F_{0b}$$

<http://b.socrative.com/Join/student>

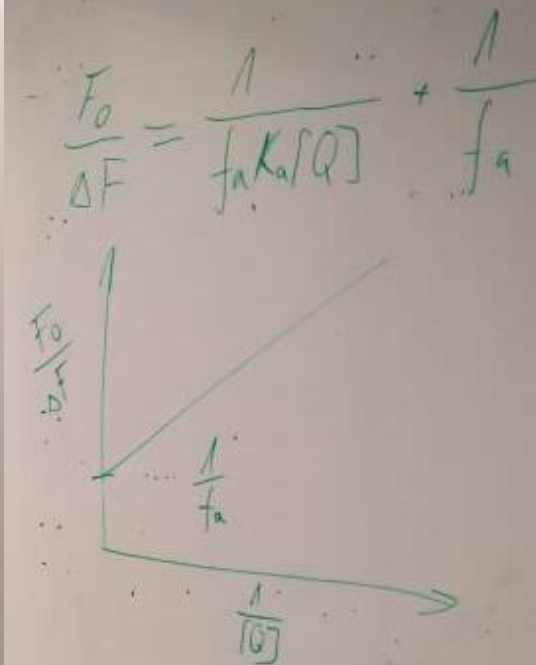
Room Name . HOFER

$$\Delta F = F_0 - F = (F_{0a} + F_{0b}) - \frac{F_{0a}}{1 + K_a[Q]} - F_{0b}$$

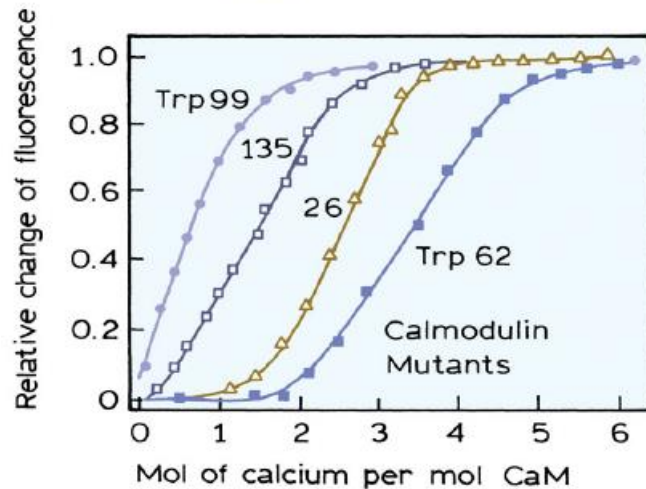
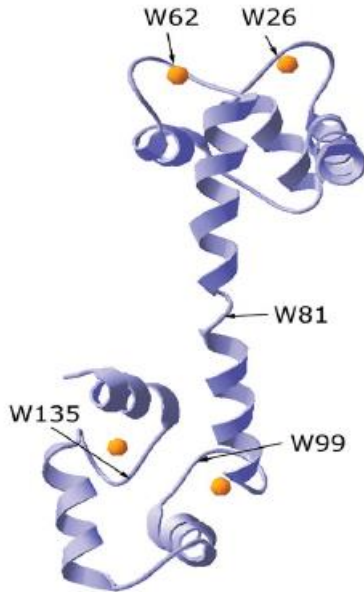
$$\Delta F = F_{0a} \left( 1 - \frac{1}{1 + K_a[Q]} \right) \quad \frac{1 + K_a[Q] - 1}{1 + K_a[Q]}$$

$$\Delta F = F_{0a} \left( \frac{K_a[Q]}{1 + K_a[Q]} \right)$$

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{\frac{F_{0a}}{f_a}}{\frac{F_{0a}}{f_a}} \left( \frac{1 + K_a[Q]}{K_a[Q]} \right) = \frac{1}{f_a} \left( \frac{1}{K_a[Q]} + 1 \right)$$

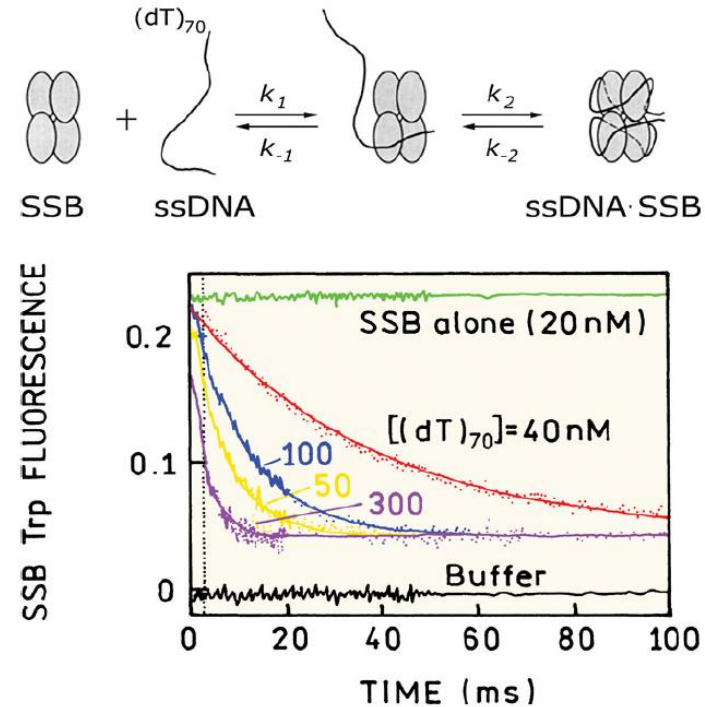
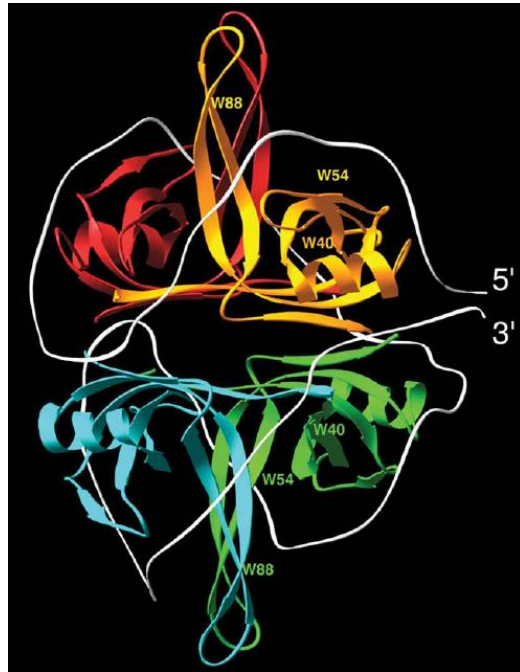


# Stanovení pořadí obsazení vazebných míst



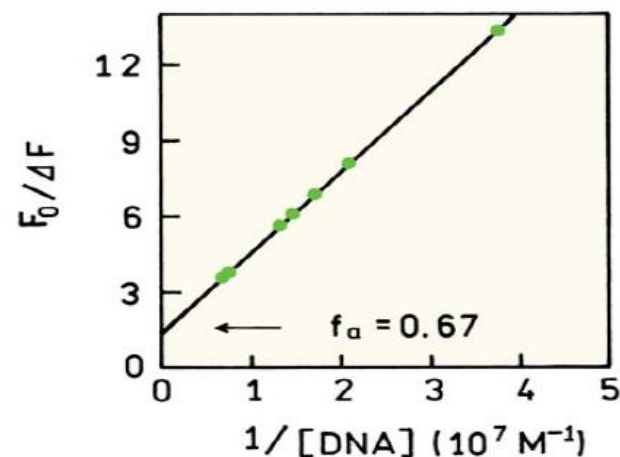
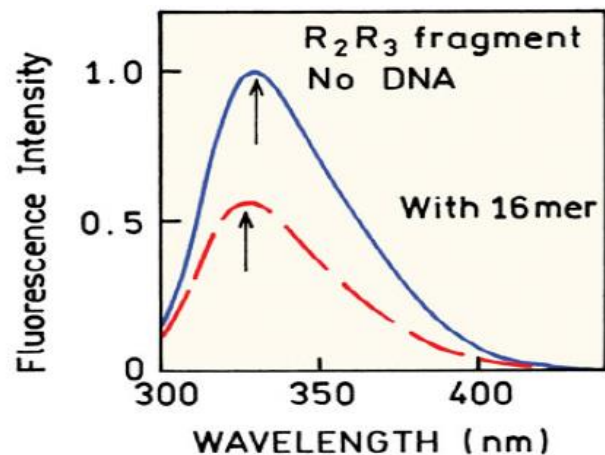
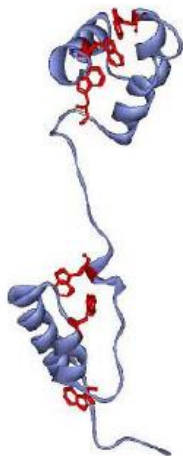
- **Kalmodulin** se váže na vápenaté ionty, dochází k jeho strukturní změně, což má za následek zvýšení schopnosti vazby k receptorům a proteinům, jejichž metabolismus reguluje.
- Cílenou mutagenézí byl zaveden vždy jeden tryptofan do blízkosti jednoho ze čtyř vazebných míst kalmodulinu a byla sledována změna fluorescence s rostoucí koncentrací vápenatých iontů.
- Porovnání závislostí ukázalo pořadí obsazování jednotlivých vazebných míst vápenatými kationty.

# Interakce proteinu a DNA



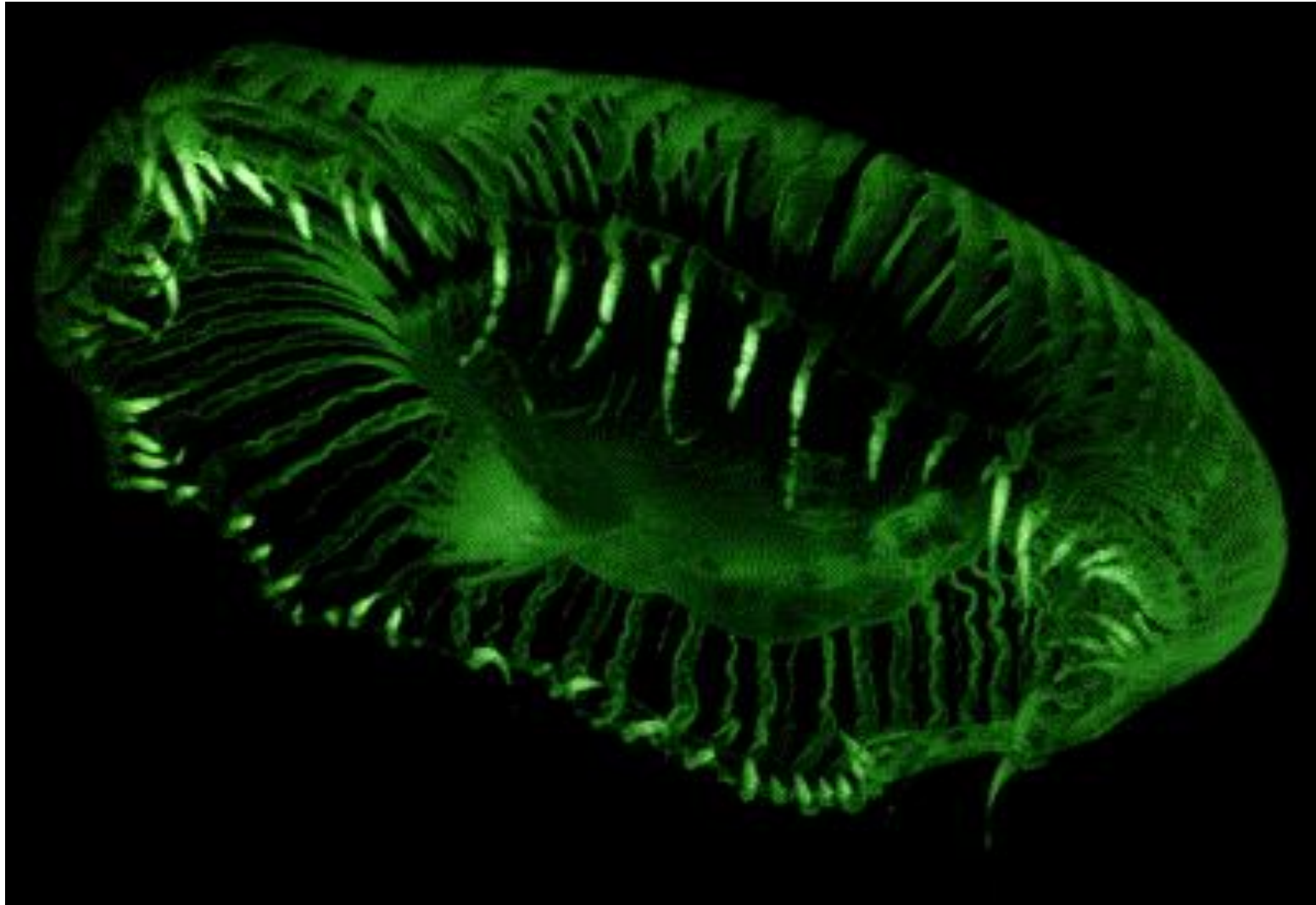
- Při interakci proteinu s DNA dohází ke zhášení tryptofanu bázemi DNA.
- Protein SSB (single-stranded DNA binding) váže DNA s velkou afinitou, ale nízkou specifitou.
- Vytváří homotetramer, který váže asi 70 nukleotidů dlouhou DNA.
- Snížení emise tryptofanu po asociaci DNA a proteinu, ukázalo, že dochází k namotání vlákna DNA kolem tetrameru.
- Označení DNA na jednom konci donorem a na druhém akceptorem ukázalo sbalení DNA kolem proteinového komplexu.

# Zhášení fluorescence tryptofanu v Myb oncoproteinů při vazbě na DNA



- Myb onkoprotein je spojován chromatinem a reguluje genovou expresi.
- N koncová část proteinu obsahuje R1, R2 a R3 doménu.
- Každá z domén obsahuje tři tryptofany, které jsou v sekvenci velmi konzervovány, což naznačuje, že se podílí na vazbě k DNA.
- Fluorescence R2R3 fragmentu Myb onkoproteinů je částečně zhášena po vazbě na DNA.
- Po vynesení závislosti fluorescence na koncentraci DNA, bylo zjištěno, že došlo ke zhášení intenzity ze 67%.
- Z toho vyplývá, že 2 ze 3 tryptofanů v každé doméně se podílejí na interakci s DNA.

# Protein, který má fluorescenci ve jméně



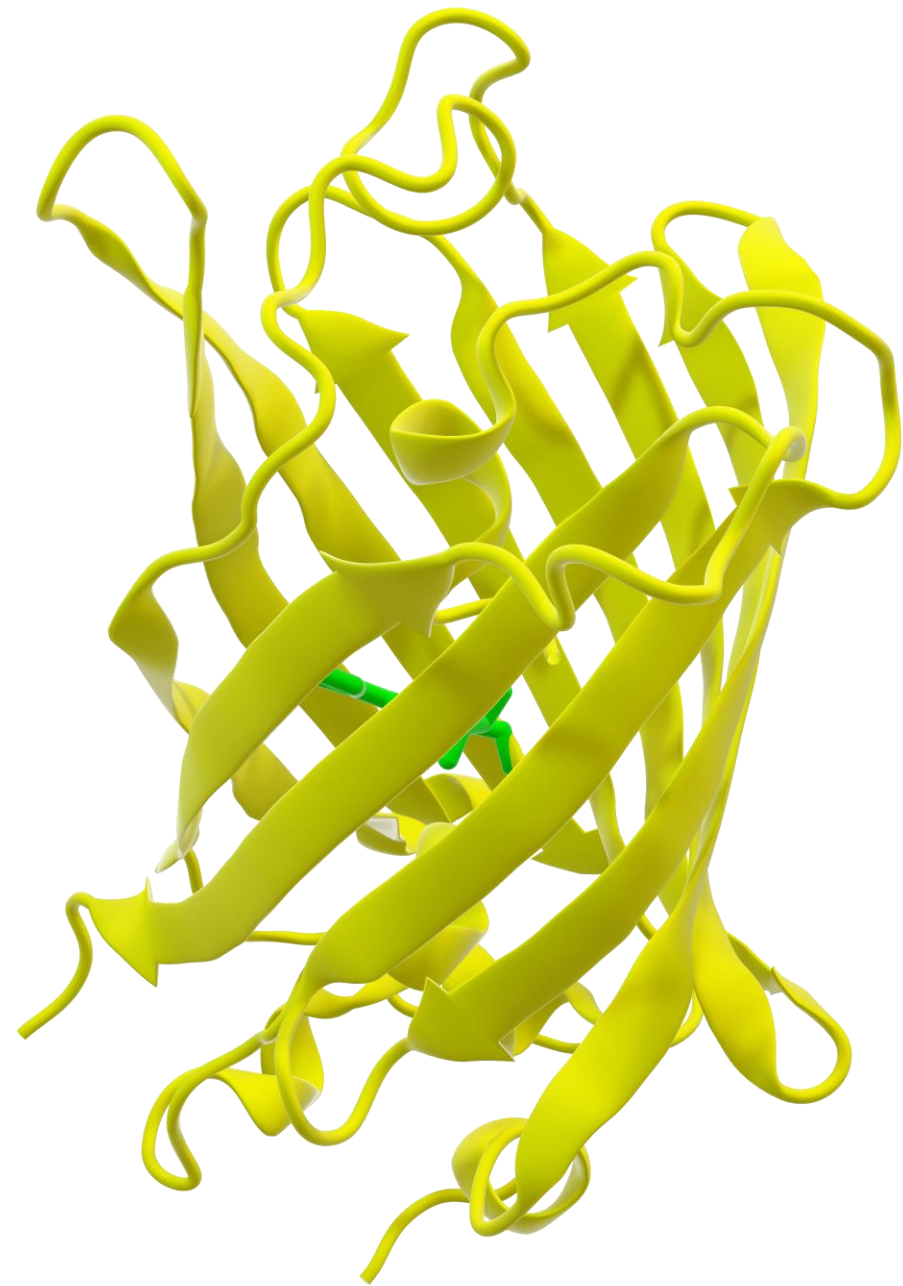
# Green Fluorescent Protein



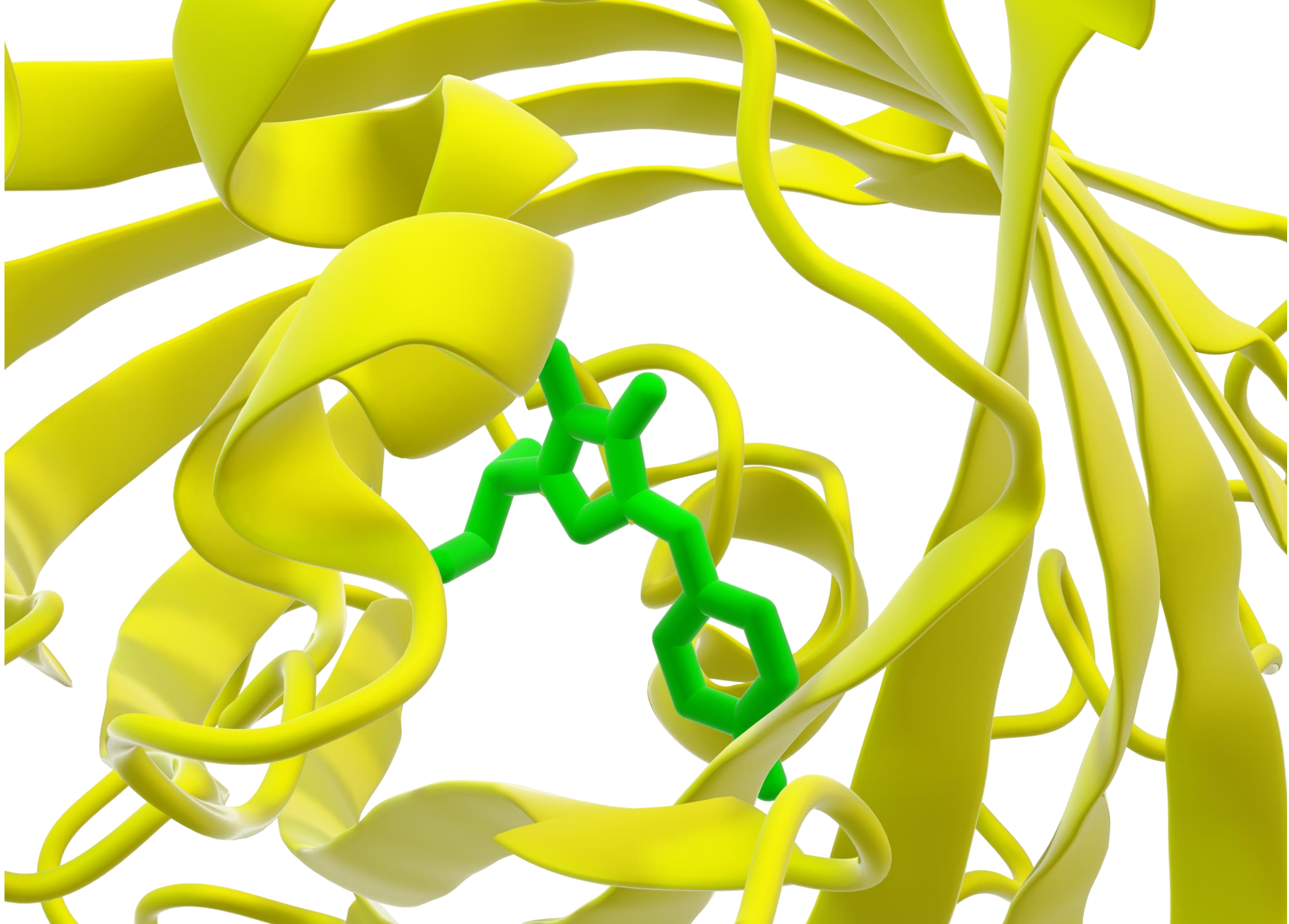
- Složen z 238 aminokyselin.
- „Barva v plechovce“ (“Paint in a can”).
- Monomer je složen z centrální  $\alpha$ -šroubovice obklopené 11 antiparalelními  $\beta$ -řetězci ve tvaru cylindru.
- Průměr struktury je 30Å a délka 40Å.
- Fluorofor se nachází na centrální  $\alpha$ -šroubovici.

$\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 507 \text{ nm}$

<http://www.cytographica.com/animations/FRET2.html>

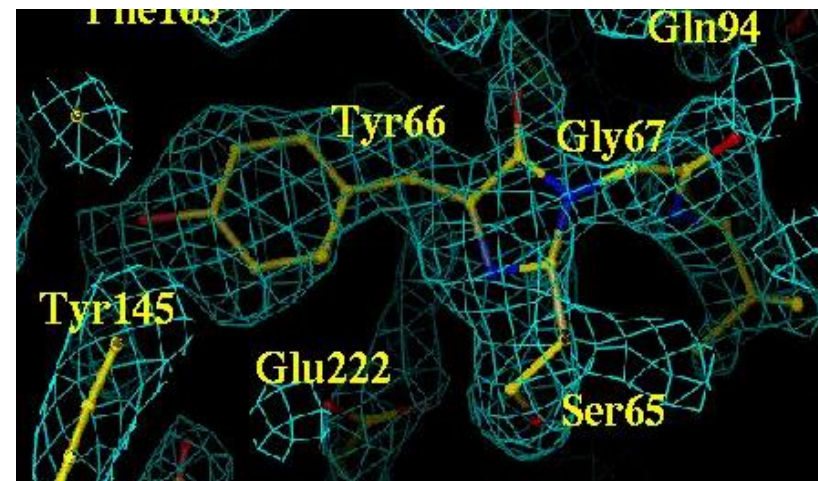




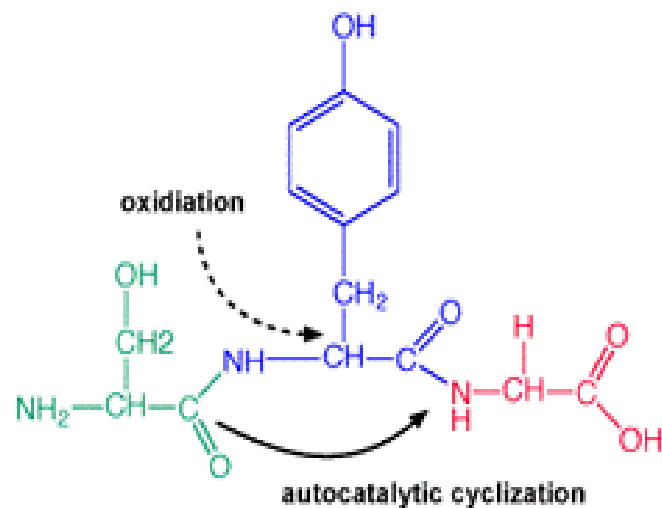


# Fluorofor v GFP

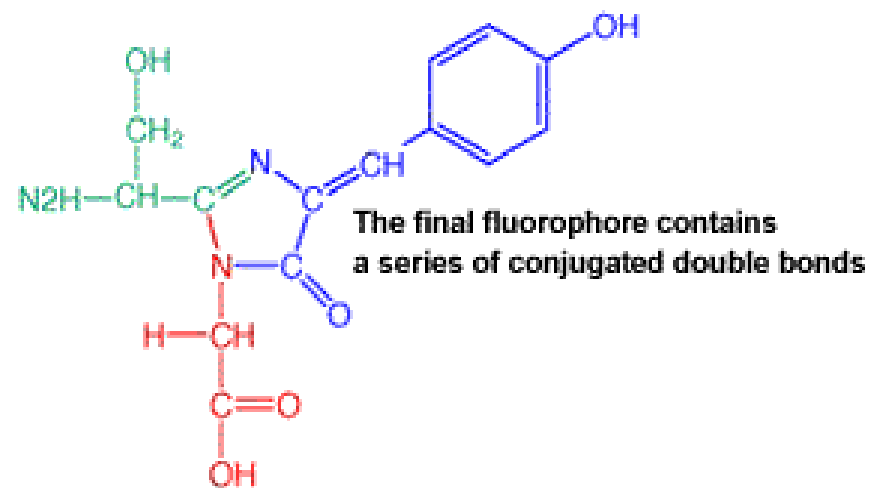
- Ser65-Tyr66-Gly67.
- Fluorofor vzniká autokatalytsky při balení proteinu ( 2-4 hod).
- Tyr66 je zdrojem fluorescence.
- Fluorofor vznikl oxidací Tyr66 a následnou samovolnou cyklizací.
- Výsledný fluorofor obsahuje konjugované dvojně vazby.



**B.**



**C.**



<http://www.olympusconfocal.com/java/fpfluorophores/gfpfluorophore/index.html>

# Využití GFP

- Lokalizace proteinů
- Dynamika proteinů a organel *in vivo*
- Transport mezi organelami
- Reportér genové exprese
- Flow cytometrie
- Purifikace proteinů
- Pohyb buněk



The Nobel Prize in Chemistry 2008

"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"



Photo: U. Montan

Osamu Shimomura



Photo: U. Montan

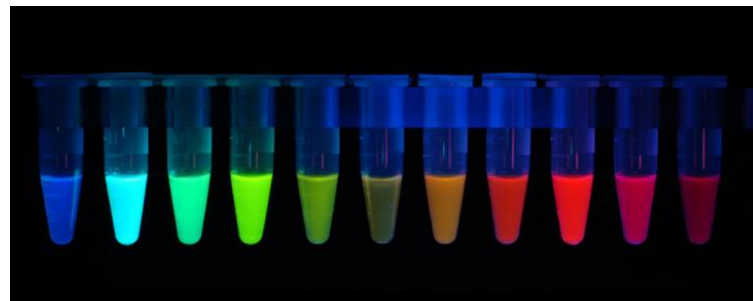
Martin Chalfie



Photo: U. Montan

Roger Y. Tsien

- GFP může být použit ke značení proteinů v živých buňkách různých organismů, díky své přirozené fluorescenci (je potřeba pouze gen kódující GFP – c-DNA 1992, Prasher).

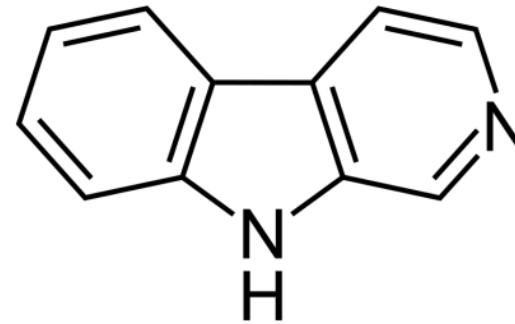


# Proč škorpión fluoreskuje?



*Superstitionia donensis*

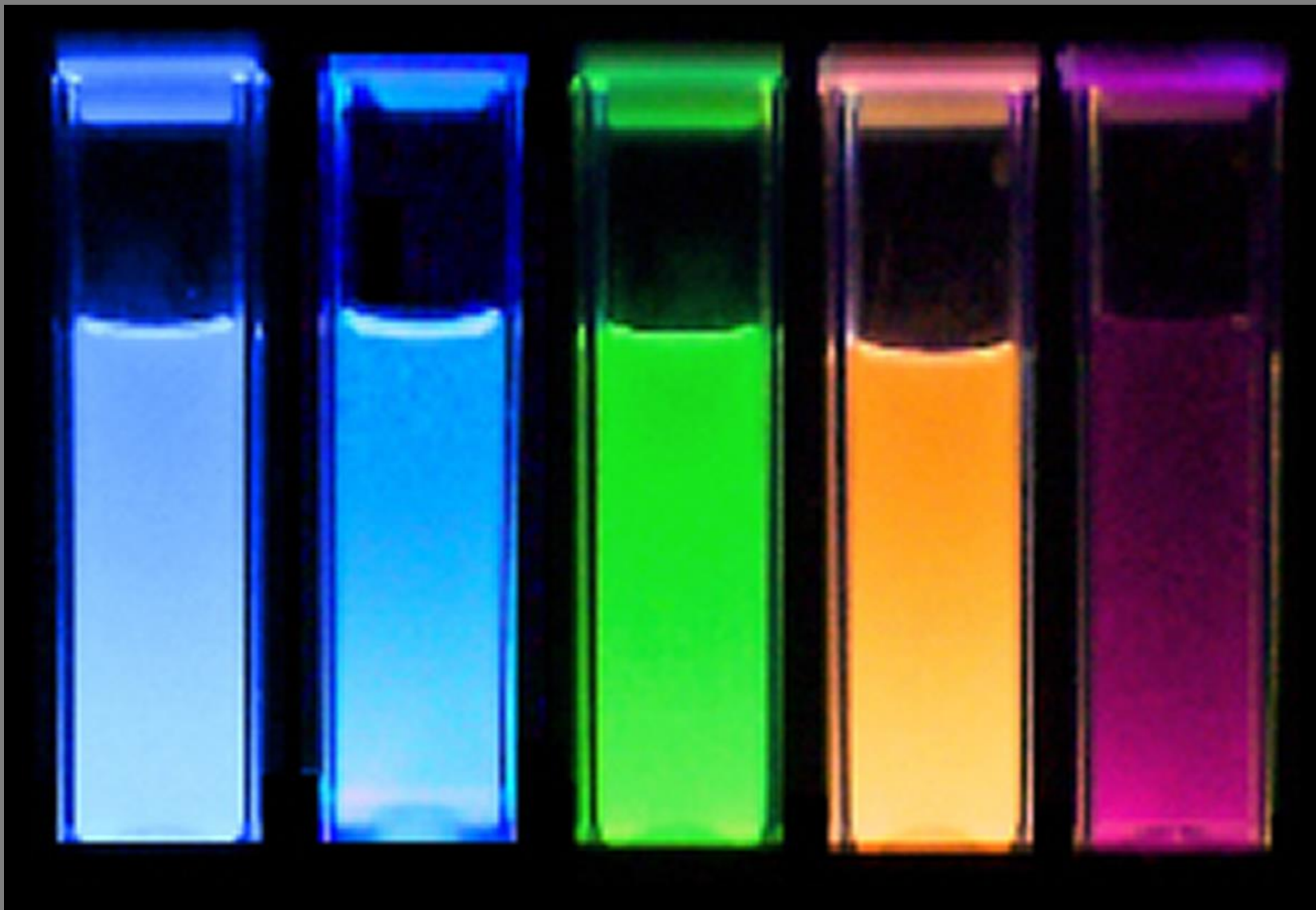
- Kutikula štíra obsahuje **beta-Carboline** (9*H*-pyrido[3,4-*b*]indole).



$\beta$  -carboline

- Je to derivát tryptofanu, který vzniká po ztvrdnutí pancíře.
- Stachel, Shawn J; Scott A Stockwell and David L Van Vranken (August 1999). "The fluorescence of scorpions and cataractogenesis". *Chemistry & Biology* (Cell Press) **6**: 531–539.

# Příště



# Literatura

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH  
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>

## Poděkování

Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J.R. Lakowitzem.