

LUCRARE DE LABORATOR

Monitorizarea denaturării proteinelor prin spectroscopie de fluorescență

Dr. Monica Focsan

1. Spectroscopia de Fluorescență

Fluorescența este proprietatea optică a unor molecule de a emite radiație electromagnetică (lumină) ca urmare a tranziției de dezexcitare de pe un nivel electronic superior pe unul inferior, în urma absorbției de radiație electromagnetică situată în domeniul UV sau vizibil.

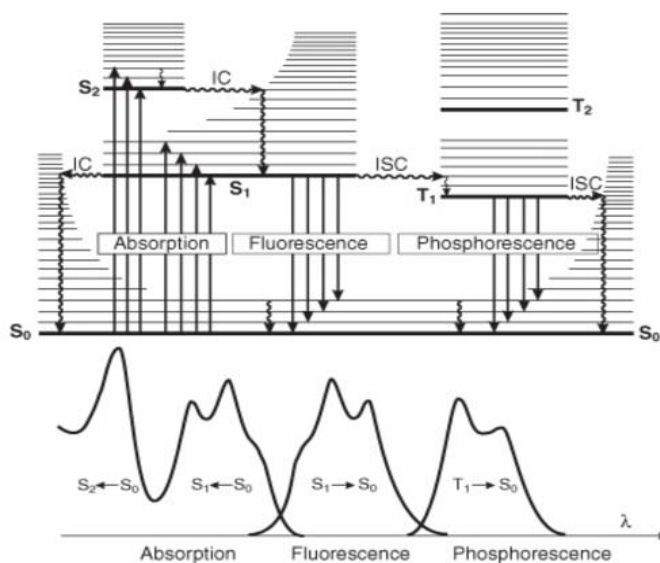


Figura 1. Diagrama Perrin-Jablonski.

Emisia radiației fluorescente încetează odată cu întreruperea iradierii moleculelor probei cu radiația electromagnetică ce poate produce trecerea moleculei din starea fundamentală într-o stare excitată.

Spectrul de fluorescență este situat la lungimi de unda mai mari decât cel de absorbție ($\lambda_{\text{absorbit}} < \lambda_{\text{emis}}$), cauza fiind pierderea energiei prin relaxarea vibrațională în starea excitată. Această diferență între maximum poziției benzii de absorbție și maximum poziției fluorescenței se numește **deplasarea Stokes** $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}}$

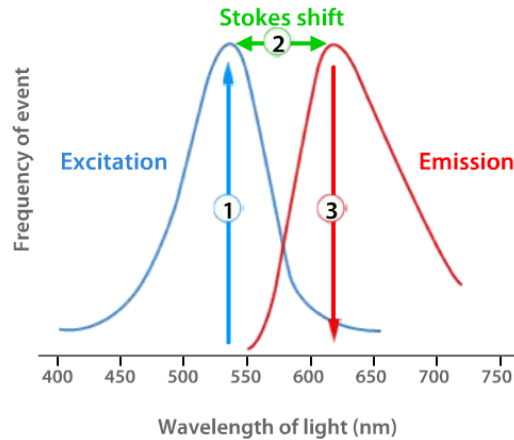


Figura 2. Deplasarea Stokes.

2. Aplicații ale Spectroscopiei de Fluorescență

O nouă tentință în nanotehnologie constă în dezvoltarea de nanomateriale cu proprietăți fizice, chimice și biologice bine cunoscute și exploatarea comportării acestora în aplicații biologice. În acest context științific, dezvoltarea de bio-nano sisteme adaptate pentru aplicații biologice relevante și specifice precum și înțelegerea sinergiei dintre aceste nanomateriale și sisteme biologice sunt câteva dintre problemele importante în nanoștiință ce trebuie riguros abordate. În acest sens, nanoparticulele de aur se bucură de un interes special datorită proprietăților plasmonice, stabilității și biocompatibilității (ne-toxicității) lor. Cu toate acestea, este bine cunoscut faptul că interacțiunea dintre proteine și nanoparticulele de aur este extrem de sensibilă la suprafața chimică a nanoparticulei, depinzând de asemenea și de starea conformațională a proteinei [Ding et al. *J. Colloid Interface Sci.* 327 2008 243–250]. În urma adsorbției, proteina își poate menține structura nativă sau, în unele cazuri, poate suferi denaturarea structurilor secundare sau terțiale. Așadar, o provocare rămâne investigarea comportamentului conformațional a proteinei în aceste nano-bio sisteme conjugate.

Datorită sensibilității sale, spectroscopia de fluorescență reprezintă o tehnică ideală pentru aplicații biochimice, putând oferi de exemplu informații referitoare la denaturarea proteinelor indusă termic. În această lucrare de laborator vom utiliza spectroscopia de fluorescență pentru

monitorizarea denaturării proteinei de albumină serică bovină (BSA) atât liberă în soluție cât și adsorbite pe suprafața nanoparticulelor de aur de formă sferică. Imobilizarea directă a proteinei BSA de suprafața nanoparticulelor de aur este necesară din mai multe motive: *i)* BSA este o proteină abundentă în plasmă, jucând un rol fiziologic important, *ii)* BSA este o proteină model cu o structură bine definită; *iii)* BSA posedă proprietăți de fluorescență specifice datorită existenței celor două reziduuri de triptofan în diferite poziții. Mai exact, BSA posedă două reziduuri de triptofan în două poziții diferite: un reziduu în partea inferioară a domeniului II hidrofobic (Trp-213) și un al doilea reziduu pe suprafața moleculei în domeniul I (Trp-134) mai expus unui mediu hidrofilic [D.C. Carter, X.J. Ho, *Adv. Protein Chem.* 45 1994 15]. Menționăm că, contribuția spectrală a fiecărui reziduu de triptofan din BSA este dificilă a fi separată.

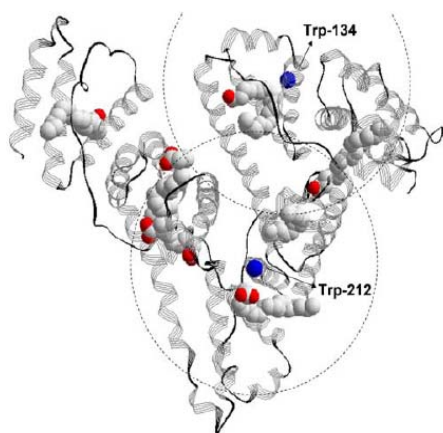
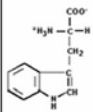
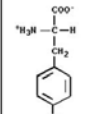
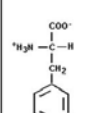


Figura 3. Structura 3D a proteinei BSA [M.D.Togashi, A.G. Ryder *J Fluoresc* 18 2008 519].

În general, fluorescența proteinei BSA este datorată celor trei aminoacizi fluorescenți: triptofan, tirozina și fenilalanina. Tabelul 1 prezintă structura lor chimică, lungimea de undă de absorbție precum și randamentul cuantic a fiecăruia.

Tabel 1. Caracteristicile amino acizilor fluorescenți.

Amino Acid	Structura Chimica	Lungimea de unda de absorbtie (nm)	Lungimea de unda de emisie (nm)	Randament cuantic
Triptofan		280	348	0.20
Tirozina		274	303	0.14
Fenilalanina		257	282	0.04

În general, deoarece fenilalanina prezintă un coeficient de extincție scăzut cuplat cu un randament cuantic mic, iar fluorescența tirozinei este –în majoritatea cazurilor- inhibată puternic de prezența unui grup amino sau carboxil sau a triptofanului, fluorescența intrinsecă a proteinelor este datorată reziduurilor de triptofan [A. Sulkowska *J. Mol. Struct.*, 614 2002 227]. În triptofan sursa dominantă de fluorescență este indolul. Mai mult, fluorescența intrinsecă a proteinei este extrem de sensibilă la modificările mediului local din jurul acesteia. Această caracteristică a fost folosită cu succes de către cercetătorii în domeniu cu scopul de a investiga modificările din mediul local a proteinei prin excitarea probei la 280 nm și monitorizarea spectrelor de emisie de fluorescență [M.R Eftink, C.A. Ghiron, *Anal. Biochem.* 1981 199]. Emisia maximă a triptofanului în proteine poate varia în domeniul spectral 308 și 355 nm în funcție de mediul local. Aceste variații în spectrul de emisie pot reflecta modificări în structura proteinei [J.R. Lakowicz, *Springer*, 2006.]. Mai mult, din spectrele de emisie astfel înregistrate este posibil obținerea de informații importante referitoare la denaturarea proteinei și tranzițiile conformaționale ale acesteia.

Denaturarea termică a proteinelor este un proces complex și de aceea elucidarea lui este vitală pentru înțelegerea stabilității proteinelor. De fapt, prin creșterea temperaturii, forma nativă a proteinei devine mai flexibilă, și ca urmare, grupurile libere -SH sau regiunile hidrofobe devin disponibile pentru noi interacțiuni intermoleculare.

3. Partea experimentală

3.1 Instrumentatia utilizata: FP-6500 Research Fluorescence Spectrometer

Lumina provenită de la o *lampă de xenon* este focalizată pe fanta de intrare a monocromatorului de excitație. Aceasta o dispersează, producând lumina monocromă. O parte din această lumină ajunge pe o fotodioda de monitorizare, iar partea cealaltă este focalizată pe centrul suportului de probe. Emisia probei este focalizată pe fanta de intrare a monocromatorului de emisie, care o dispersează, apoi această lumină trece prin fanta de ieșire, ajungând în final pe tubul fotomultiplicator. Atât lumina incidentă pe fotodiodă, cât și cea pe tubul fotomultiplicator sunt convertite în câte un semnal electric, care la rândul lor sunt digitizate în convertoare analog-digital și transmise la ieșire, cu ajutorul unui calculatorului, sub forma de spectru.

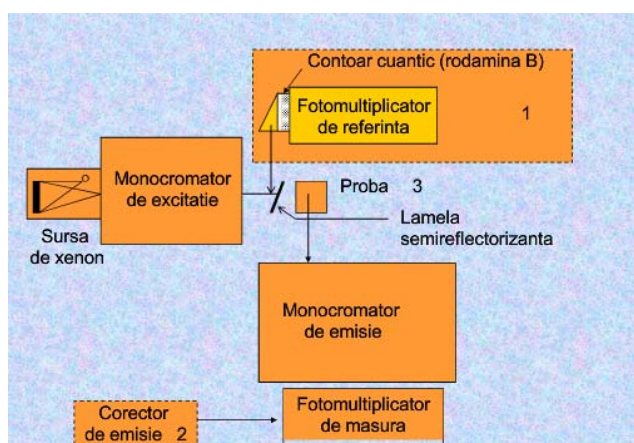


Figura 4. Schema de principiu a unui spectrofluorimetru.

3.2. Obiectivul lucrării

În lucrarea de față vom investiga modificările structurale care însoțesc denaturarea termică a proteinei BSA, înainte și după adsorbția pe suprafața nanosferelor de aur, prin monitorizarea emisie de fluorescență a reziduurilor de triptofan din albumină.

Pașii lucrării

1. Se prepară o soluție proteică de 1 mg/mL de BSA.
2. Se înregistrează spectrele de emisie și de excitație a soluției proteice de albumină.

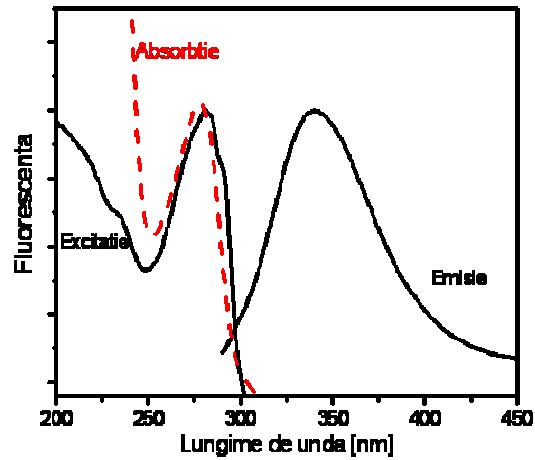


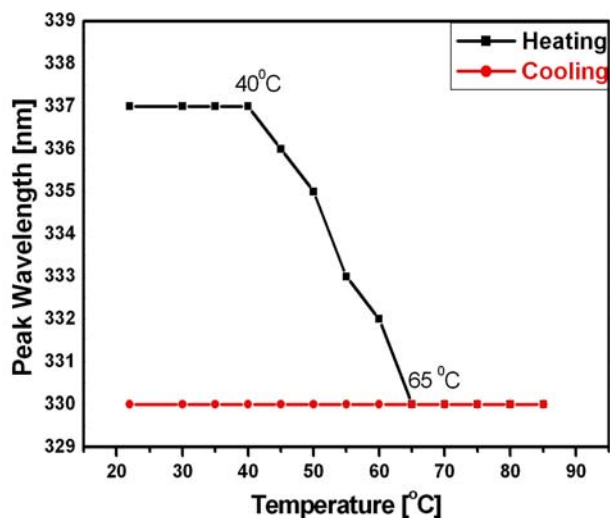
Figura 5. Spectrele de excitație, de emisie și absorbție normalizate ale soluției de BSA;

$$\lambda_{ex}=285 \text{ nm}$$

3. Se monitorizează deplasarea poziției maximului de emisie, respectiv a intensității de emisie a soluției de albumină între 22 °C și 85 °C la un interval de 5 minute.

Temperatura (°C)	Lungime de unda de emisie	
	BSA	Bioconjugate BSA@GNPs
22		
35		
40		
42		
45		
50		
60		
62		
65		
70		
72		
75		
85		

4. Se reprezintă grafic dependența poziției maximului de emisie în funcție de temperatură (vezi J. Photochem. Photobiol., A 217 (2011) 395-401).



5. Se determină temperaturile de tranziție, concluzionând asupra modificărilor conformaționale ale proteinei.
6. Se compara temperaturile de tranziție ale moleculei de albumina in solutie comparativ cu cea adsorbite pe suprafața nanoparticulelor de aur (GNPs).

Proba	Temperatura de tranziție 1 (°C)	Temperatura de tranziție 2 (°C)
BSA		
Bioconjugate BSA@GNPs		