

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

Biophysikalisches Grundpraktikum

V6 - Proteinfaltung

Bestimmung der eGFP Stabilität

Dr. Gabriele Schreiber

Praktikumsleiterin:

Email: gabriele.schreiber@staff.hu-berlin.de

WS 2021/2022

Inhalt

V6 – Proteinfaltung - Bestimmung der eGFP Stabilität

1. Einführung und theoretische Grundlagen	2
1.1 Generelle Versuchsübersicht	2
1.2 Proteinfaltung	2
1.3 Green Fluorescent Protein	4
1.4 Fluoreszenz	6
1.5 Platereader	7
1.6 Thermodynamik der Entfaltung	8
2. Versuchsdurchführung	9
2.1 Versuchsvorbereitung	9
2.2 Versuchsdurchführung	9
2.3 Beendigung des Versuches	12
3. Anfertigung des Protokolls	12
Literatur und Bildverzeichnis	13

1. Einführung und theoretische Grundlagen

1.1 Generelle Versuchsübersicht

Proteine können nur in einer korrekt gefalteten Konformation ihre biologische Funktion erfüllen. Im Falle von eGFP (enhanced GFP) heißt das, dass nur das nativ gefaltete Protein die markante grüne Fluoreszenz zeigt. Durch gerichtete Denaturierung des Proteins kann man diese Funktionalität reduzieren bzw. gänzlich auslöschen. In diesem Versuch soll nun durch chemisch (Zugabe von Guanidinhydrochlorid), sowie thermisch induzierter Denaturierung (Entfaltung) die Abnahme der Funktionalität (in diesem Fall Fluoreszenz) charakterisiert werden. Dies erlaubt durch einige einfache thermodynamische Annahmen Rückschlüsse auf die freie Enthalpie von eGFP, ΔG_{eGFP} , die der Stabilität des Proteins entspricht.

Dafür ist der Versuch in drei Teilexperimente unterteilt. Zuerst soll ein Absorptions-, Exzitations- und Emissionsspektrum des nativen/gefalteten eGFP aufgenommen werden (Teil A). Daraufgehend wird in einem Vorversuch eGFP durch die Zugabe von Guanidinhydrochlorid (0-5.4 M) denaturiert und der Bereich der kritischen Guanidinhydrochlorid-Konzentration bestimmt (Teil B). Um das lineare Verhalten in diesem Übergangsbereich näher zu charakterisieren wird die Guanidinhydrochlorid-Konzentrationen in diesem Bereich feiner unterteilt und die eGFP Denaturierung wiederholt (Teil C).

1.2 Proteinfaltung

Die Grundlage jedes funktionellen Proteins bildet seine Aminosäuresequenz. Diese Sequenz, auch Primärstruktur genannt ist die direkte Übersetzung der DNA-Sequenz-Triplets in ihre zugehörigen Aminosäuren. Als lineare Polypeptidkette werden die einzelnen Aminosäuren durch die Ribosomen verknüpft. Aus dieser Polypeptidkette können sich nun erste definierte Sekundärstrukturelemente herausbilden. Die bedeutendsten sind α -Helices und β -Faltblätter. Die α -Helix ist das am häufigsten vorkommende räumliche Strukturelement. Bereits vorhergesagt durch Linus Pauling konnte diese durch die erste dreidimensionale Struktur eines Proteins (Myoglobin) durch Max Perutz und John Kendrews [1] bewiesen werden. Charakteristisch dauert eine Umdrehung innerhalb der Helix 3.6 Aminosäurereste. Die Helix wird stabilisiert durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxyl- und Amidresten benachbarter Aminosäurereste. Im Unterschied hierzu werden beim β -Faltblatt die Wasserstoffbrücken zwischen verschiedenen Segmenten im Protein ausgebildet. Beispielhaft sind die beiden Strukturelemente in Abb. 1 dargestellt.

Durch die gerichtete Faltung der bereits ausgebildeten Sekundärstrukturen erhält das Protein seine eigentliche Struktur. Diese wird stabilisiert durch verschiedene Kräfte innerhalb des Proteins. Dazu zählen: ionische, polare, Van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Disulfid-Brücken und hydrophobe Effekte. In einigen Fällen werden spezielle Hilfsproteine benötigt, die die korrekte Faltung der Proteine unterstützen. Sie werden Chaperone genannt. Diese (monomere) Struktur eines Proteins kann bereits funktional sein und wird als Tertiärstruktur bezeichnet.

Einige Proteine funktionieren jedoch nur im Verband mit gleichen oder verschiedenen Proteinen. Man spricht hierbei von Homo- oder Heterooligomeren. Diese Oligomerisierung bildet den letzten Schritt der Proteinfaltung und wird als Quartärstruktur zusammengefasst.

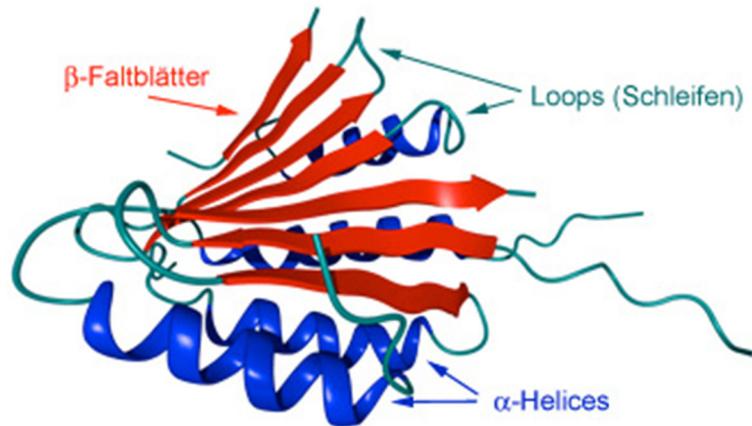


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente [2]

Lange war es unklar, wie die Faltung von Proteinen so schnell ablaufen kann. Betrachtet man die Polypeptidkette als isoliertes Glied, so scheinen die Möglichkeiten für verschiedene Faltungen nahezu unbegrenzt. Heute weiß man, dass die Faltung energetisch als „Potentialtopf“ dargestellt werden kann (Abb. 2). Die Faltung ist also ein gerichteter Prozess, der das Protein in die energetisch stabilste Konformation bringt. Entlang dieses „Energietrichters“ gibt es Nebenminima, in denen das Protein verharren kann bevor es die eigentliche funktionale Konformation erreicht.

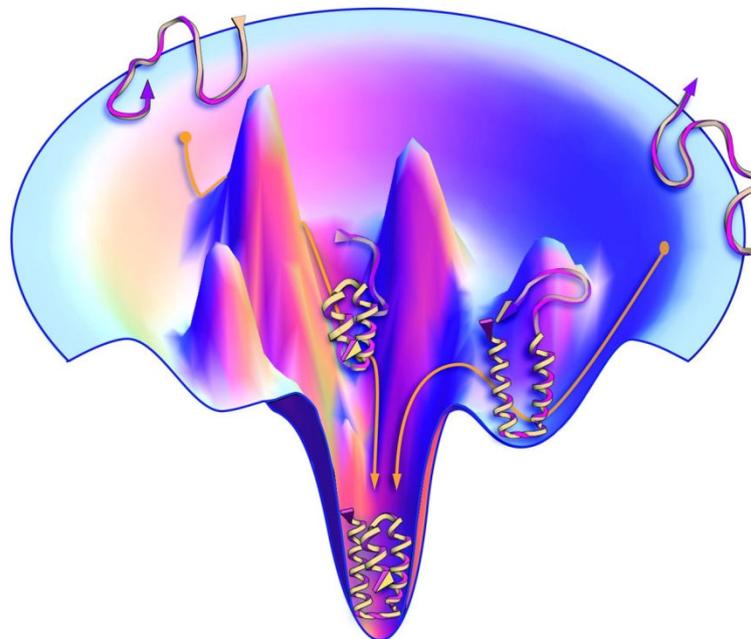


Abbildung 2: Beispielhafter Potentialtopf einer Proteinfaltung [3]

Um in diesem Versuch nun Rückschlüsse auf die Stabilität des nativen(gefalteten) eGFPs ziehen zu können wird das Protein entfaltet. Hierbei betrachten wir zwei Arten der Entfaltung, auch Denaturierung genannt. Die Denaturierung mittels des chaotropen Salzes Guanidinhydrochlorid (GuaHCl) ist reversibel, wohingegen die Denaturierung mittels Hitze zu einem irreversiblen Verlust der Tertiärstruktur und somit der biologischen Aktivität führt. Eine alternative Denaturierungsmethode besteht in der Änderung des pH-Wertes. Chaotrope Salze ermöglichen die Solvatisierung der unpolaren Gruppen im Inneren des Proteins durch Wassermoleküle. Dadurch werden die hydrophoben Wechselwirkungen und die Wasserstoffbrücken zerstört. Bei der Hitzedenaturierung kommt es ebenfalls zum Bruch nicht kovalenter Bindungen. Der Grad der Hitzedenaturierung ist stark von der verwendeten Temperatur und dem zu denaturierenden Protein abhängig. Bis zu gewissen Temperaturen sind die Änderungen im Protein nur auf die Tertiärstruktur beschränkt, dann ist das Protein noch in der Lage bei einer Verringerung der Temperatur zu renaturieren und die Denaturierung somit reversibel. Wird allerdings eine kritische, so genannte Schmelztemperatur, überschritten wird das Protein gänzlich zerstört. Man spricht hierbei von einer irreversiblen Denaturierung. Das bekannteste Beispiel hierfür ist wohl das Braten eines Eis.

Um im vorliegenden Versuch die Denaturierung von eGFP zu verfolgen, wird die Abnahme der Fluoreszenz verfolgt. Alternativ kann die Faltungsanalyse durch Circular dichroismus-Spektren oder die Messung der dynamischen Lichtstreuung erfolgen.

1.3 Green Fluorescent Protein

GFP stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* und ist seit dem damit verbundenen Nobelpreis (Shimomura, Chalfii, Tsien, 2008) selbst vielen Laien ein Begriff. Dieses Protein *revolutionierte* vor allem die Zellbiologie und verdankt seine Popularität der guten Expression in jedem Zelltyp und seiner vielseitigen Anwendung. Hauptanwendung ist die Markierung von Proteinen durch GFP (Fusionskonstrukte), die somit durch mikroskopische Methoden detektiert werden können. So kann z.B. der Expressionsort eines „getaggten“ Proteins oder Interaktionspartner identifiziert werden (FRET). Darüber hinaus kommt GFP als Expressionsreporter und modifiziertes GFP als Biosensor zum Einsatz[4][5].

Das 238 Aminosäuren umfassende Protein bildet eine aus 11 β -Faltblättern bestehende typische β -Barrel Struktur aus (Abb. 3), die den Chromophor („Lichtantenne“) umschließt. Die Besonderheit dieses Chromophores ist, dass dieser autokatalytisch gebildet wird (Abb. 4). Er besteht aus den drei Aminosäuren: Serin, Tyrosin und Glycin, die ein konjugiertes Doppelbindungssystem ausbilden [6], das durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden kann. Bei der Wiederherstellung des ursprünglichen Energieniveaus wird Licht längerer Wellenlänge (Fluoreszenz) freigesetzt.

V6 – Proteinfaltung - Bestimmung der eGFP Stabilität

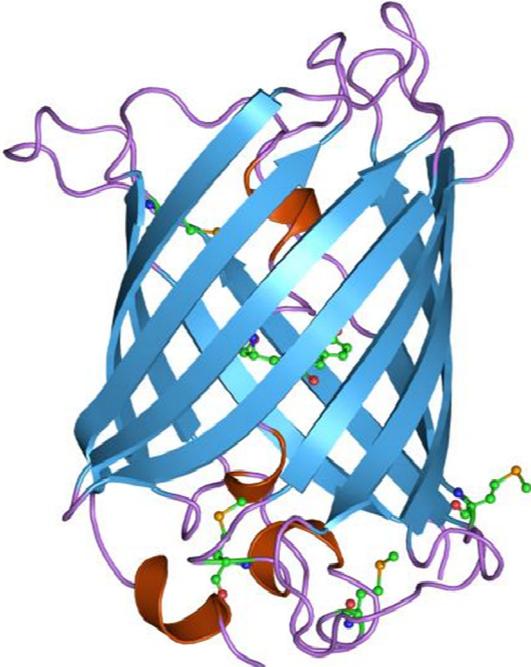


Abbildung 3: Darstellung des GFP aus *Aequorea victoria* [UniProt: P42212]

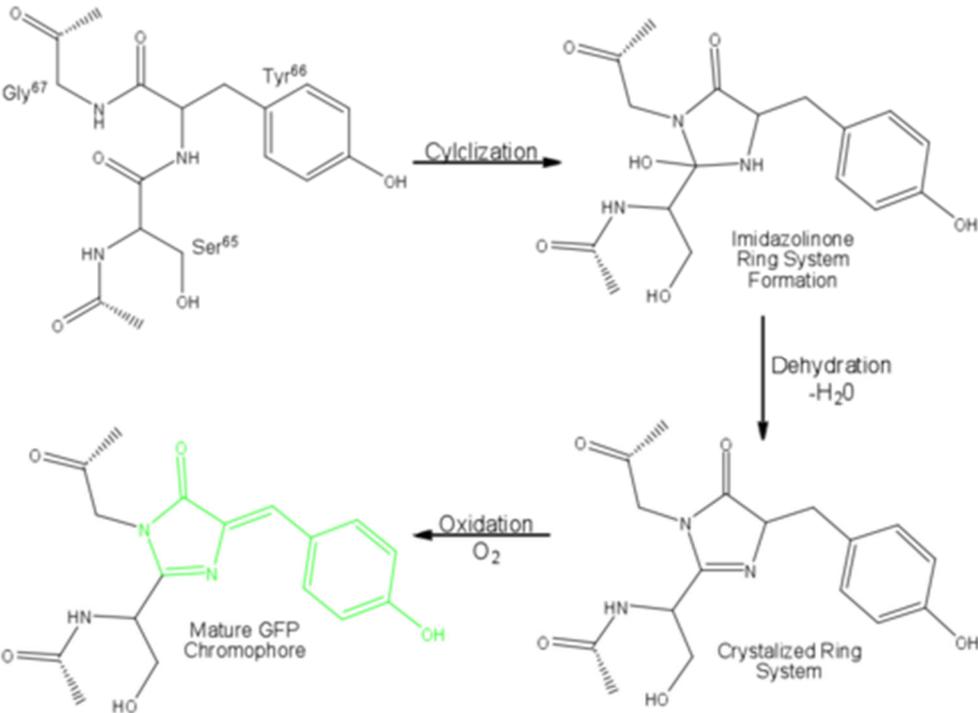


Abbildung 4: Ausbildung des konjugierten Doppelbindungssystems [7]

1.4 Fluoreszenz

Generelle Basis für das Fluoreszenz-Phänomen sind Übergänge zwischen verschiedenen Energieniveaus. Hierbei wird der Energiegehalt eines Moleküls untergliedert in Elektronen-, Schwingungs- (Vibrations)- und Rotationszustände, die im Jablonski-Term-Schema verdeutlicht sind, siehe Abb. 5. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Rotationsniveaus in Abb. 5 nicht vermerkt. Im Grundzustand befindet sich das Molekül in einem Schwingungsgrundzustand und die Valenzelektronen in einem elektronischen Grundzustand S0. Absorbiert ein Molekül Licht bestimmter Wellenlänge werden die Elektronen in einen höheren Zustand S1 angeregt. Zudem erfolgt ein Übergang in angeregte Schwingungsniveaus. Diese entsprechen meistens nicht dem vibrationellen Grundzustand des angeregten elektronischen Zustandes S1. Aus den beschriebenen Übergängen leitet sich das Absorptionsspektrum, auch Exzitationsspektrum genannt, ab.

Zur Wiederherstellung des Ausgangszustands erfolgt nun zunächst eine strahlungslose/thermische Relaxation in den vibrationellen Grundzustand des elektronisch angeregten Zustands S1. Dieser Prozess wird „Internal Conversion (IC)“ genannt. Aus dem Grundzustand des elektronisch angeregten Zustandes S1 relaxiert das System nun in den elektronischen Grundzustand S0. Da es sich um einen energetisch ärmeren Zustand handelt, muss hierbei Energie freigesetzt werden. Dies kann durch Emission eines Photons geschehen, dessen Wellenlänge durch die Energiedifferenz festgelegt ist. Zieht man nun die durch IC bereits freigewordene Energie ab, erkennt man, dass die Fluoreszenzstrahlung energieärmer als die eingestrahlte Lichtstrahlung sein muss. Dadurch kommt es zu einer Rotverschiebung der Fluoreszenz gegenüber dem Anregungslicht (Stokes-Shift).

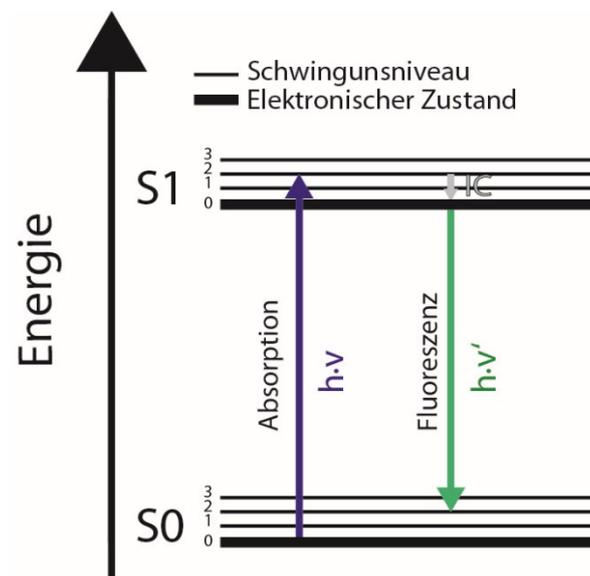


Abbildung 5: Jablonski-Term-Diagramm eines elektronischen Systems mit zwei energetischen Zuständen

Im Fall von Wildtyp GFP gibt es zwei Absorptionsmaxima. Eines bei 395 nm und eines bei 475 nm. Wobei die Absorptionsamplitude bei 395 nm in etwa dreimal höher ist als bei 475 nm. Regt man das Protein bei 395 nm an, emittiert es Licht bei 508 nm, während eine Anregung bei 475 nm in einer Emission bei 503 nm resultiert. Erklärt wird dieses Phänomen durch die Tatsache, dass eine Mischung aus zwei GFP Spezies vorliegt. Während ein deprotonierter oder anionischer Chromophor (475 nm Absorption) in der einen Spezies vorliegt, weist die andere Spezies einen protonierten oder neutralen Chromophor (395 nm Absorption) vor. Auf Grund des weiten Anwendungsgebietes von GFP, gab es immer die Nachfrage nach neuen und verbesserten Varianten. 1995 gelang es dem Tsien und Thastrup Lab durch zwei Punktmutationen in der Nähe des Chromophors: F64L und S65T die spektralen Eigenschaften des GFPs für die Anwendung zu optimieren. Diese zwei Mutationen resultierten in einer erhöhten Photostabilität und Fluoreszenzintensität, sowie der Verschiebung des Anregungsmaximums auf 488 nm, während das Emissionsmaximum bei 508 nm verblieb [8]. Diese Verbesserungen brachten der Mutante den Namen „enhanced GFP (eGFP)“ ein. In diesem Versuch wird auf Grund der distinkten spektralen Eigenschaften auch mit eGFP gearbeitet.

1.5 Platereader

Zur Untersuchung der Absorption, Exzitation und Fluoreszenz von eGFP wird ein Platereader der Firma Tecan verwendet (M200 Infinite Pro). Abb.6 verdeutlicht das Messsystem zur Aufnahme eines Exzitation- oder Emissionsspektrums. Eine Xenonlampe stellt das Messlicht bereit, das auf durch einen Exzitations-Monochromator auf die bestimmte Wellenlänge eingestellt wird. Über den Lichtleiter 1 und Spiegel wird das Licht von unten an die Probe geleitet. Das Messsignal (z.B. emittierte Fluoreszenz) gelangt über einen 2. Lichtleiter zum Emissions-Monochromator an den Photo-Multiplier-Detektor.

Fluorescence Intensity Bottom Diagram

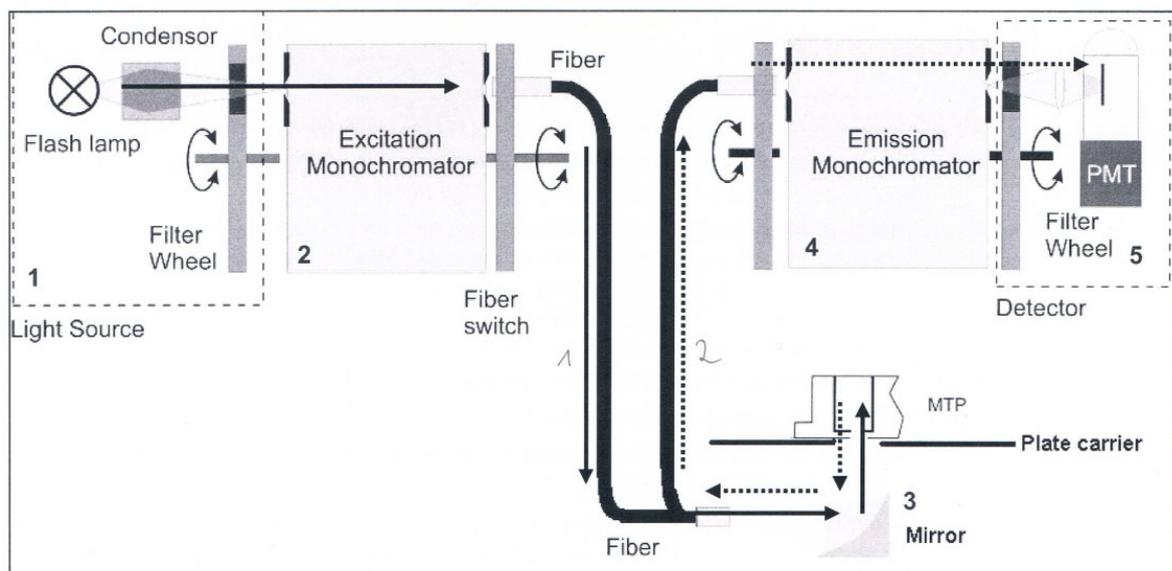


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Messsystems des Tecan M200 Infinite pro

1.6 Thermodynamik der Denaturierung

Bei vielen Proteinen verläuft die Faltung nach Austritt aus dem Ribosom exergonisch (freiwillig/spontan), d.h. Energie wird frei ($dG < 0$), sofern die Reaktionskinetik dies zulässt. Dies bedeutet, dass eine große Aktivierungsenergie die spontane Faltung verhindern kann.

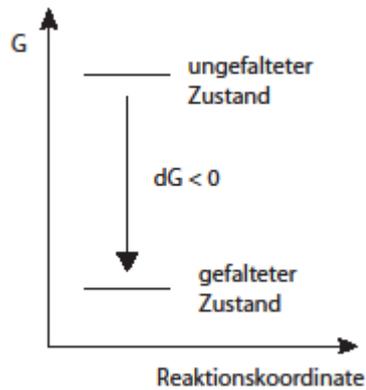
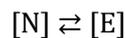


Abbildung 7: vereinfachtes Energiediagramm des Faltungsprozesses

Um die Stabilität von eGFP zu bestimmen, wird dG -Wert berechnet, der nötig ist, um das Protein wieder zu entfalten ($[N] \rightarrow [E]$). (Generell können nur dG -Werte und nicht die absoluten G -Werte bestimmt werden.)

Denaturierungsexperimente lassen sich mit Titrations vergleichen und die Entfaltung wird in Abhängigkeit des denaturierenden Faktors, der GuaHCl Konzentration, gemessen. Der reversiblen Entfaltung liegt ein Gleichgewichtsprozess zu Grunde. Im einfachsten Fall kann man von einem System mit zwei Zuständen ausgehen: dem gefalteten/nativen Protein (N) und dem entfaltetem/denaturierten Protein (E).



Die Gleichgewichtskonstante K der Denaturierungsreaktion: $[N] \rightarrow [E]$ ist dann gegeben durch:

$$K = [E]/[N]$$

Die Änderung der Enthalpie bei der Entfaltung lautet entsprechend:

$$\Delta G = - R \cdot T \cdot \ln(K)$$

Um K und somit ΔG zu berechnen, wird eine normierte Denaturierungskurve (normierte Fluoreszenzintensität gegen GuaHCl-Konz) erstellt. Für die Normierung wird angenommen, dass bei 0 M GuaHCl nur gefaltetes eGFP (f_n) vorliegt und somit $f_n(0 \text{ M GuaHCl}) = 1$. Bei vollständiger Entfaltung (maximaler GuaHCl-konzentration) ist der Anteil an gefaltetem Protein $f_n = 0$. Da angenommen wird, dass nur die beiden Zustände entfaltet und gefaltet vorliegen, kann nun der Anteil an entfaltetem Protein (f_e) durch $f_e = 1 - f_n$ berechnet werden (gespiegelte Denaturierungskurve).

Mit den so bestimmten Anteilen f_n und f_e kann für jede GuaHCl Konzentration K und dG berechnet werden. Da f_n vor dem Übergangsbereich ~ 1 und nach dem Übergangsbereich ~ 0 ist, ist der Übergangsbereich entscheidend. Im Idealfall verhalten sich in diesem Bereich die Werte $\Delta G[\text{GuaHCl}]$ in erster Näherung linear zu den Konzentrationen von GuaHCl. Damit kann die freie Enthalpie **der Entfaltung** (**[N]** \rightarrow **[E]**) in Abwesenheit von GuaHCl und somit die Stabilität des nativen eGFP durch eine lineare Regression bestimmt werden.

2. Versuchsanleitung

2.1 Versuchsvorbereitung

Zur Vorbereitung des Versuches ist die angegebene Tabelle (Tab. 1) bereits zu Hause zu berechnen. Verstehen Sie den Rechenweg; dieser wird im Testat und im Laufe des Versuchstags nochmals verwendet. Das Gesamtvolumen pro Messkammer soll 200 μl betragen. Die Stammlösung GuaHCl hat eine Konzentration von 6 M.

Tabelle 1: Pipettiervorschrift zur Abschätzung des linearen Bereichs

GuHCl [M]	Protein [μl]	Puffer [μl]	GuHCl [μl]
0	10	190	
1	10		
2	10		
3	10		
4	10		
5	10		
5.7	10		190

2.2 Versuchsdurchführung

Bringen Sie einen Taschenrechner und einen USB-Stick mit!

Zur Durchführung der Experimente werden 500 μl aufgereinigtes eGFP sowie jeweils 5 ml 6 M GuaHCl Stammlösung, und Probenpuffer bereitgestellt. Da es sich bei eGFP um eine biologische Probe handelt, deren Präparation aufwendig ist, sind die Versuchsteilnehmer dazu angehalten nicht mehr als die für den Versuch notwendige Menge zu verbrauchen. Versuchen Sie luftblasenfrei zu pipettieren. Falls eine Luftblase entsteht, kann diese mithilfe einer Pipettenspitze entfernt werden. Es wird auf konzentriertes und organisiertes Arbeiten Wert gelegt.

Alle Ansätze für die im Folgenden beschriebenen Experimente werden in einer 96 Well-Platte (Greiner 96 clear flat black) angesetzt und mit Hilfe eines Tecan Infinite M200 Pro Platereaders vermessen. Hierbei ist darauf zu achten, dass die 96 Well-Platte nur mit aufgesetztem Deckel in den Platereader gestellt werden darf. Stellen Sie sicher, dass vor jeder Messung die Routine „Shaking“ ausgeführt wird (Duration: 2 sec, Amplitude: 2.5mm, Mode: Orbital). Benennen Sie die resultierenden Excelsheets und speichern Sie die Excelmappe nach jeder Messung in ihrem Projektordner.

Versuchsteil A: Parametrisierung des nativen eGFP

- I. Zur Erstellung des Absorptionsspektrums wird in eine der Probenkammern 10 µl Protein mit 190 µl Puffer verdünnt. Wählen Sie für alle Messungen die Platte: Greiner 96 Flat Transparent aus und haken Sie die Option: plate with cover. Die Probe wird in der Routine „**Absorbance scan**“ mit den folgenden Einstellungen: From: 350, To: 520, Step: 2, Number of flashes: 3 vermessen. Wo liegt das Absorptionsmaximum?

- II. Für die Erstellung des Exzitationsspektrums rufen Sie die Routine „**Fluorescence Intensity Scan**“ auf. Wählen Sie zunächst als Scan Selection: Excitation Scan. Wählen Sie den Bereich der Excitation wavelength basierend auf der vorherigen Messung (maximal wavelength: 505 nm, step =2 nm). Stellen Sie weiterhin folgende Parameter ein und markieren Sie die zu messenden wells:

a. Mode:	Bottom
b. Gain:	70
c. Lag Time:	0
d. Integration Time:	20
e. Settle Time:	0
f. Emission Wavelengths	530 nm
g. Number of flashes:	10

- Vergleichen Sie das Absorptionsmaximum mit der vorherigen Messung.
- III. Für das Emissionsspektrum wählen Sie nun als Scan selection: Emission Scan aus. Schätzen Sie selbständig den Bereich des Emissionsspektrums ab. Bedenken Sie hierbei das theoretisch voraussehbare Emissionsmaximum und den Zusammenhang zwischen Anregungs- und Emissionsspektrum. Geben Sie basierend auf der vorherigen Messung die Anregungswellenlänge ein. Beachten Sie hierbei, einen genügend großen Abstand (ca 30 nm) zwischen der Exzitation- und der kleinsten Emissionswellenlänge, da sonst Anregungslicht direkt auf den Detektor fällt. Lassen Sie die anderen Werte unverändert. Bei welcher Wellenlänge liegt das Emissionsmaximum?

 - IV. Für die Messung des maximalen Fluoreszenzwerts wählen Sie nun die Routine „**Fluorescence Intensity**“ aus. Übernehmen Sie die Parameter aus der vorherigen Emissions Scan-Messung. Als Emissionswert tragen Sie die Wellenlänge des Emissionsmaximums ein. Beachten Sie für die Exitationswellenlänge wieder einen Abstand von 30 nm. Speichern Sie die Routine in Ihrem Projektordner.

Versuchsteil B: Denaturierung von eGFP mit GuaHCl

Im Folgenden wird eGFP mithilfe von GuaHCl denaturiert. Hierzu wird ein grober Konzentrationsbereich verwendet um den Übergangsbereich der Denaturierung zu ermitteln. Pipettieren Sie nun die in Abschnitt 2.1 „Versuchsvorbereitung“ ermittelte Verdünnungsreihe. (Pipettier-tip: Vermerken Sie sich am Rand der Tabelle das jeweilige Ziel-well)

- I. Laden Sie nun die abgespeicherte Routine zur Messung der **Fluorescence Intensity**, aktualisieren Sie die zu vermessenden Wells und vermessen die Proben.
- II. Inkubieren Sie die Platte bei 75°C, überprüfen Sie zuvor die Temperatur im Inkubator. Nach 15 min vermessen Sie die Ansätze. Schätzen Sie aufgrund der Werte den Übergangsbereich ab.

Versuchsteil C: Detaillierte Vermessung des linearen Bereiches

Wählen Sie selbständig 12 Ansätze verschiedener GuaHCl-Konzentrationen um den Übergangsbereich zu vermessen und berechnen Sie die zu pipettierenden Volumina. (Intervalle ≥ 0.2). Beachten Sie, dass die Konzentrationswerte für 0, 1, 5 und 5.7 für die spätere Auswertung benötigt werden. Schließen Sie diese Werte entsprechend in ihrem Experiment mit ein. (Pipettier-tip: Vermerken Sie sich am Rand der Tabelle das jeweilige Ziel-well).

Tabelle 2: Pipettiervorschrift des linearen Bereichs

GuHCl [M]	Protein [μ l]	Puffer [μ l]	GuHCl [μ l]
0	10	190	
1	10		
	10		
	10		
	10		
	10		
	10		
	10		
	10		
	10		
5	10		
5.7	10		190

Schütteln Sie die Platte im TecanReader. (Um Pipettierfehler zu erkennen können sie die wells vor der Hitzedenaturierung im Tecan vermessen und gegeben falls betroffene Zusammensetzungen erneut pipettieren)

Inkubieren Sie die Platte nun für 15 min bei 75°C und vermessen Sie die Fluoreszenz mittels der abgespeicherten Routine erneut. Aktualisieren Sie die zu vermessenden Wells.

2.3 Beendigung des Versuchs

Speichern Sie die alle aufgezeichneten Daten auf einem USB-Stick ab.

Spülen Sie die Platte mit EtOH und Destwasser und klopfen Sie diese auf Zellstoff aus. Putzen Sie Ihren Arbeitsplatz (feuchter Zellstoff) und hinterlassen Sie diesen, wie Sie ihn vorgefunden haben

3. Anfertigung des Protokolls

Das Protokoll wird mit max. 5 Punkten bewertet. Es soll wie folgt gegliedert sein:

- I Einführung
- II Versuchsziel
- III Beschreibung der Methode
- IV Ergebnisse
- V Diskussion
- VII Anhang: 1 Seite: Tabelle mit Rohdaten & berechneten Werten

Für die Teile I-III wird eine zusammengefasste Übersicht erwartet. Beschränken sich hierbei auf maximal eine Seite. Die genaue Versuchsdurchführung ist hinreichend im Skript beschrieben und soll nicht wortwörtlich wiedergegeben werden. Die Form des Protokolls und sowie der fachlich präzise Ausdruck fließen in die Bewertung des Protokolls mit ein.

Der **Ergebnisteil** soll analog zur Versuchsdurchführung in die Teile A, B und C unterteilt werden.

Teil A:

- Graphische Darstellung des Absorptionsspektrums
- Graphische Darstellung des Exzitation- & Emissionsspektrums.
- Worin unterscheiden sich Exzitations- und Absorptionsspektrum?
- Bestimmen Sie die Maxima des Exzitations- und Emissionsspektrums. Erklären Sie warum sie welche Exzitations-/Emissionswellenlänge für die Fluoreszenz Intensity Messung benutzt haben.

Teil B:

- Graphische Darstellung der Denaturierungskurven nach 15 min Inkubation bei 75°C. Kennzeichnen Sie den Übergangsbereich und vermerken Sie, welche Konzentrationen Sie für die Bestimmung des linearen Übergangsbereiches verwendet haben.

Teil C:

V6 – Proteinfaltung - Bestimmung der eGFP Stabilität

- Graphische Darstellung der Fluoreszenzwerte gegen die GuaHCl Konzentrationen und Beschreibung des Graphen.
- Fügen Sie die Rohdaten, sowie der berechneten Daten (Normierungen, K, ΔG) dem Anhang bei (nur für Teil C). Darzustellen auf einer Seite, als Tabelle.

Datenauswertung zur Bestimmung der eGFP Stabilität & Diskussion:

- Normieren Sie die Fluoreszenzintensitäten aus Versuchsteil C im Intervall [0,1] mithilfe der Informationen aus der Einleitung (1.6). Setzen Sie diese Datenreihe als Denaturierungskurve fest und spiegeln Sie nun die normierte Kurve. Stellen Sie beide Datenreihen in einer Grafik gegen die GuaHCl Konzentration dar. Zeichnen Sie den linearen Bereich ein!
- Bestimmen Sie nun $K = \frac{[\text{Denaturiert}]}{[\text{Nativ}]}$ im linearen Bereich. Berechnen Sie nun ΔG mit der idealen Gaskonstante R (8,314 J/(mol*K)) und einer angenommenen Temperatur von 25°C. Vermerken Sie, ob sich ΔG auf den Entfaltungs- oder den Faltungsprozess bezieht. Stellen Sie ΔG gegen die GuaHCl Konzentrationen dar. Verhalten sich die ΔG -Werte linear zu GuaHCl Konzentration. Wenn nein, was könnte der Grund sein? Entscheiden Sie, ob eine lineare Regression sinnvoll ist und geben Sie die Gleichung an. Bestimmen Sie ΔG bei 0 M GuaHCl.
- Für die Diskussion: Wie ordnen Sie den ermittelten Wert ein? Nehmen Sie hierbei Bezug auf die in der Einleitung dargestellten Grundlagen. Welche Energie muss aufgewendet werden, um eGFP zu entfalten? Fertigen Sie eine schematische Zeichnung, gemäß Abb. 7, an und zeichnen Sie Ihren berechneten ΔG Wert ein. Verläuft die **Entfaltung** endergonisch oder exergonisch und was könnte der Hintergrund für die zusätzlich Hitzeinkubation sein? Auf das Eingehen dieser Fragen, wird bei der Bewertung des Protokolls gesonderten Wert gelegt! Achten Sie auf wissenschaftlich präzisen Ausdruck.
- Vergleichen Sie den ermittelten Wert mit Literaturwerten. Zitieren Sie hierbei richtig.
- Diskutieren Sie mögliche Fehlerquellen.

Literatur und Bilderverzeichnis

- 1- Kendrew, John C., et al. "A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis." *Nature* 181.4610 (1958): 662-666.
- 2- URL: <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/MathNat/Biologie/Didaktik/Photosynthese/glossar/bilder/sekundaerstruktur.jpg>
- 3- Dill, Ken A., and Justin L. MacCallum. "The protein-folding problem, 50 years on." *Science* 338.6110 (2012): 1042-1046.
- 4- Shimomura, Osamu. "Discovery of green fluorescent protein (GFP)(Nobel Lecture)." *Angewandte Chemie International Edition* 48.31 (2009): 5590-5602.
- 5- Nienhaus, G. Ulrich. "The green fluorescent protein: a key tool to study chemical processes in living cells." *Angewandte Chemie International Edition* 47.47 (2008): 8992-8994.
- 6- Bublitz, Gerold, Brett A. King, and Steven G. Boxer. "Electronic structure of the chromophore in green fluorescent protein (GFP)." *Journal of the American Chemical Society* 120.36 (1998): 9370-9371.
- 7- URL: http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Green_Fluorescent_Protein
- 8- Tsien, Roger Y. "The green fluorescent protein." *Annual review of biochemistry* 67.1 (1998): 509-544.