

Zastosowanie pomiarów fluorescencji w biochemii i chemii bionieorganicznej

Łukasz Orzeł, Janusz Dąbrowski

Zespół Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej, Wydział Chemii UJ

FLUORESCENCJA

Energia wzbudzenia cząsteczki może zostać wykorzystana do pokonania bariery aktywacji w procesie fotochemicznym. Najczęściej zdarza się jednak, że zostaje ona oddana, a cząsteczka wraca do swojego stanu podstawowego. Jednym ze sposobów dezaktywacji wzbudzonych stanów elektronowych jest emisja fotonu. W przypadku, gdy jest ona następstwem absorpcji światła mamy do czynienia z fotoluminescencją. W zależności od rodzaju stanu wzbudzonego, z którego następuje emisja, wyróżnia się fluorescencję i fosforescencję.

Fluorescencja jest szybkim procesem fotofizycznym, zachodzącym w czasie $\sim 10^{-8}$ s. Ponieważ bezpromienista dezaktywacja wyższych stanów oscylacyjnych wzbudzonego stanu elektronowego zachodzi jeszcze szybciej (ok. 10^{-12} s), fluorescencję obserwuje się jedynie z najniższego oscylacyjnego poziomu pierwszego elektronowego stanu wzbudzonego. W przeciwieństwie do znacznie wolniejszego procesu fosforescencji, fluorescencja nie pociąga za sobą zmiany multipletowości.

Podobnie jak w przypadku absorpcji, intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do stężenia substancji emitującej (w zakresie niskich stężeń; dla wysokich stężeń charakterystyczne jest zjawisko autowygazania). Zależność ta ma postać:

$$I_F = k \cdot I_0 \cdot c \cdot s$$

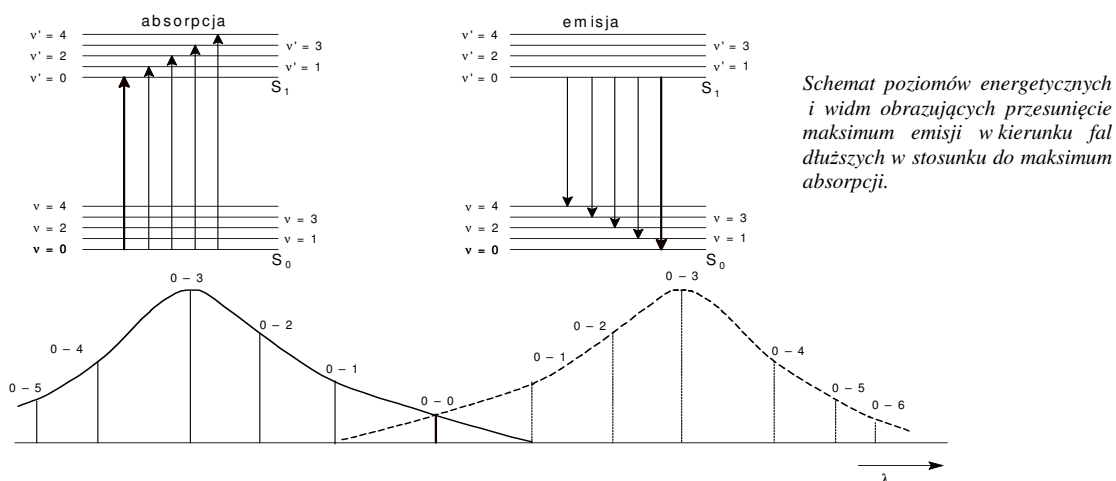
gdzie: k – stała proporcjonalności

I_0 – natężenie promieniowania wzbudzającego

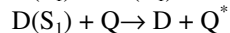
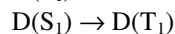
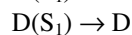
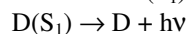
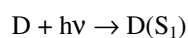
c – stężenie

s – grubość warstwy absorbującej

Poprzez porównanie widm absorpcyjnych i fluorescencyjnych danej substancji, możemy wyznaczyć energię pierwszego wzbudzonego stanu singletowego S_1 , gdyż energia przejść 0-0 jest jednakowa w przypadku absorpcji i emisji.



W przypadku obecności w badanym układzie innych cząstek zwanych wygaszaczami (np. Γ , O_2 , akrylamid) możliwy jest jeszcze jeden sposób powrotu układu do stanu podstawowego poprzez przekazanie energii cząsteczce wygaszacza. Wpływ wszystkich tych procesów można opisać całościowo równaniem Sterna-Volmera (zakładamy stan równowagi):



absorpcja

fluorescencja

konwersja wewnętrzna

przejście interkombinacyjne

wygazanie fluorescencji

$$V_a = I_a$$

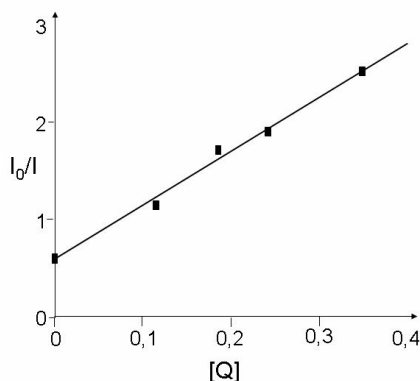
$$V_f = k_f [S_1]$$

$$V_{IC} = k_{IC} [S_1]$$

$$V_{ISC} = k_{ISC} [S_1]$$

$$V_Q = k_Q [Q] [S_1]$$

gdzie: $k_f, k_{IC}, k_{ISC}, k_Q$ – stałe szybkości
 I_a – natężenie padającego promieniowania
 $[Q]$ – stężenie wygaszacza
 $[S_1]$ – stężenie substancji w stanie singletowym
 D – substrat



Wykres Sterna–Volmera dla dynamicznego wygaszania fluorescencji.

Wykres Sterna–Volmera z definicji musi mieć punkt przecięcia $I_0/I_w = 1$ dla zerowego stężenia wygaszacza. Jeżeli wykres taki jest nieliniowy, mechanizm wygaszania jest bardziej złożony i przy wyższych stężeniach wygaszacza istotniejsze może się stać wygaszanie statyczne.

Nieliniowy, mechanizm wygaszania jest bardziej złożony i przy wyższych stężeniach wygaszacza istotniejsze może się stać wygaszanie statyczne.

$$\frac{I}{I_w} = 1 + K_{SV} \cdot [Q]$$

$$K_{SV} = \frac{k_q}{k_f + k_{IC} + k_{ISC}} = k_q \cdot \tau_0$$

gdzie: I – natężenie fluorescencji bez wygaszacza.
 I_w – natężenie fluorescencji w obecności wygaszacza.
 τ_0 – czas fluorescencji bez wygaszacza.
 k_q – stała wygaszania.

W przypadku występowania więcej niż jednego fluoroforu należy uwzględnić poszczególne udziały. Wobec tego ogólne równanie Sterna–Volmera przyjmuje postać:

$$\frac{I_w}{I} = \sum_{i=1}^n \frac{f_i}{1 + K_{SV_i} \cdot [Q] \cdot e^{V_i [Q]}}$$

gdzie: I_0 – natężenie fluorescencji bez wygaszacza
 I – natężenie fluorescencji w obecności wygaszacza
 f_i – ułamek całkowitej fluorescencji układu
 $[Q]$ – stężenie wygaszacza
 V – stała gaszenia statycznego
 K_{SV_i} – stała Sterna-Volmera charakteryzująca proces dynamicznego wygaszania

Gdy K_{SV_i} znacząco różnią się od siebie, występują odchylenia ujemne od wykresów Sterna–Volmera. Zależność ta jest liniowa dla wygaszania dynamicznego (kolizyjnego). Jednakże może mieć miejsce także wygaszanie statyczne (bardzo szybkie $\approx 10^{-15}$ s), polegające na utworzeniu niefluoryzującego kompleksu z wygaszaczem, lub na „natychmiastowym” odebraniu energii przez znajdującą się bardzo blisko (promień Van der Waalsa) cząstkę wygaszacza. Występowanie takiego wygaszania daje odchylenia od linii prostej (odchylenie dodatnie).

Aby uzyskać pełną charakterystykę widm fluorescencyjnych zbiera się dwa rodzaje widm: emisyjne i ekscytacyjne. Pierwsze z nich - widmo emisyjne - jest zależnością intensywności emisji w funkcji długości fali przy zadanej długości fali wzbudzenia. Natomiast widmo wzbudzenia przedstawia zależność intensywności emisji od długości fali przy zadanej długości fali emisji. Jest więc widmem wzbudzenia „czystego” związku. W takim przypadku widmo wzbudzenia służy weryfikacji czystości próbki dla której wykonano widmo absorpcyjne (a zatem powinno mieć taki sam kształt jak widmo absorpcyjne).

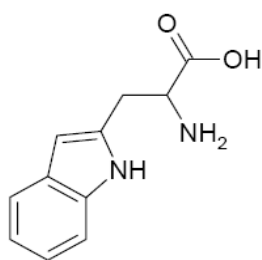
FLUORESCENCJA ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE CZYNNYCH.

Substancjami wykazującymi zjawisko fluorescencji wśród związków biologicznie czynnych są między innymi:

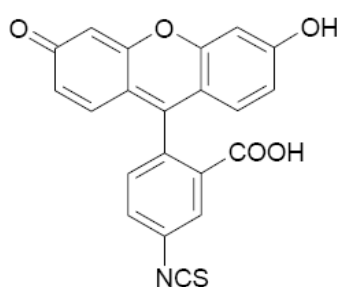
- Aminokwasy aromatyczne: tryptofan, tyrozyna, fenyloamina
- Zasady nukleinowe w DNA i RNA: adenina, guanina, cytozyna, tymina, uracyl
- Barwniki roślinne: chrofile, bakteriochlorofile i karotenoidy
- Witaminy i hormony: np. ryboflawina

Związki fluoryzujące można podzielić na następujące grupy:

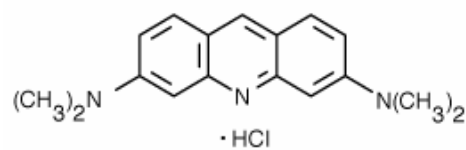
- Wewnętrzne.
Przykładem niech będzie jeden z aminokwasów – tryptofan, zawierający w swojej strukturze grupę indolową. Wykazuje on fluorescencję przy długości fali wzbudzenia 280 nm i długość fali emisji 340 nm).
- Zewnętrzne.
W przypadku, gdy badany związek nie wykazuje fluorescencji, możliwa jest jego modyfikacja chemiczna za pomocą fluoroforu zewnętrznego. Jednym z przykładów jest izotiocyjanian fluoresceiny, który reaguje z wolnymi grupami aminowymi obecnymi w strukturach białek.
- Wskaźniki fluorescencyjne.
Grupa wskaźników chemicznych stosowanych w analityce medycznej- w punkcie końcowym miareczkowania następuje zmiana fluorescencji próbki, lub biologii komórki- barwienie komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Przykładami mogą być stosowane do barwienia komórkowego oranż akrydyny, jodek propidyny, błękit trypanu.



tryptofanu,



izotiocyjanian fluoresceiny,



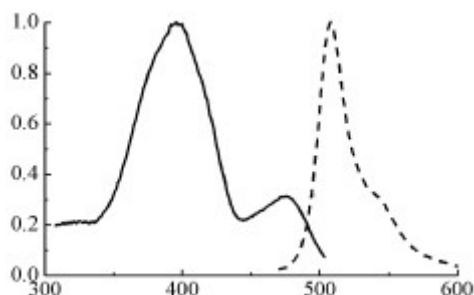
oranż akrydyny

Wysoka czułość spektroskopii fluorescencyjnej pozwala na jej zastosowania kliniczne. Rutynowo wykonuje się oznaczanie aminokwasów, ryboflawiny, tiaminy czy kwasu foliowego we krwi i innych płynach fizjologicznych w szczególności, gdy jest dostępna niewielka ilość próbki. Przykładem zastosowania fluorymetrii w biotechnologii jest badanie aktywności enzymów. W takich pomiarach monitoruje się reakcję, w której nie fluoryzujący lub słabo fluoryzujący substrat przekształcany jest w fluoryzujący produkt. W nowoczesnych laboratoriach szeroko stosuje się mikroskopy fluorescencyjne np. do wizualizacji obiektów biologicznych. Przykładem są barwniki używane do sprawdzania żywotności komórek pozwalające na procentowe określenie ilości komórek żywych i martwych (barwienie jodkiem propidyny i oranżem akrydyny). Metoda fluorescencji jest również niezwykle przydatna w badaniach biodystrybucji i farmakokinetyki leków zawierających fluorofor bądź połączonych z zewnętrznym fluoroforem. Innym zastosowaniem medycznym może być obrazowanie nowotworów, chorób immunologicznych, neurologicznych czy cukrzycy.

WYKORZYSTANIE FLUORESCENCJI DO OKREŚLANIA ELEMENTÓW STRUKTURALNYCH BIAŁEK.

Spektroskopia fluorescencyjna jest metodą często stosowaną w badaniach białek. Z analizy widm fluorescencyjnych danej cząsteczki białkowej oraz z ich zależności od różnych czynników środowiskowych (takich jak pH, temperatura, lepkość) można wyciągnąć szereg ciekawych wniosków np. na temat struktury przestrzennej białka czy oddziaływania z innymi cząsteczkami. Białka zawdzięczają swoje właściwości fluorescencyjne obecności w łańcuchu polipeptydowym aromatycznych aminokwasów – tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny. Ich fluorescencja przypada na zakres bliskiego ultrafioletu. Maksimum absorpcji dla fenyloaminy to 260 nm, a emisji- 282 nm. Dla tyrozyny następuje przesunięcie w stronę niższych energii, maksimum absorpcji przypada na długość fali 275 nm, a emisji 304 nm. Widma absorpcji tryptofanu przesunięte są w jeszcze bardziej długofalową część UV. Maksimum absorpcji dla tryptofanu to 295 nm, a emisji 353 nm. Wydajności kwantowe tryptofanu i tyrozyny są zbliżone (odpowiednio 0,13 i 0,14) i kilkakrotnie wyższe niż fenyloalaniny (0,02). Emisja tryptofanu jest bardzo wrażliwa na wpływ otoczenia (rozpuszczalnik, wygaszacze). Ponieważ białka zawierają wiele reszt aminokwasów, podlegających różnym czynnikom środowiska, ich fluorescencja jest heterogenna, co przejawia się przede wszystkim zależnością parametrów emisji od długości fali promieniowania wzbudzającego. Decydującą rolę dla fluorescencji białek będą odgrywały reszty tryptofanu, gdyż fluorescencja pochodząca od tyrozyny jest w znacznym stopniu wygaszona, natomiast emisję pochodzącą od fenyloalaniny obserwuje się w niewielu przypadkach. Do wygaszania fluorescencji w białkach dochodzi w skutek wewnątrzcząsteczkowego kompleksu nakładających się na siebie pierścieni aromatycznych. Wygaszenie fluorescencji ma tu zarówno charakter statyczny jak i dynamiczny.

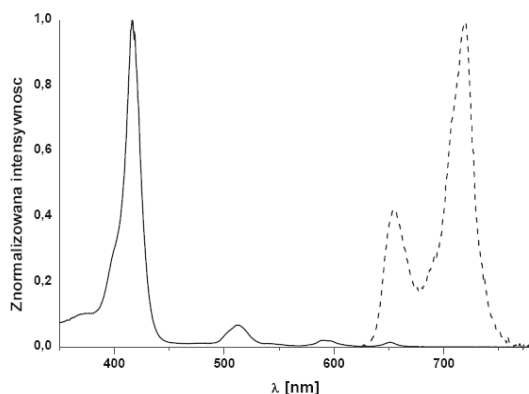
Istnieją także nietypowe białka, których fluorescencja jest widoczna nawet gołym okiem. Przykładem jest białko zielonej fluorescencji GFP (Green Fluorescent Protein). Jego fluorescencja w zielonej części widma promieniowanie elektromagnetycznego pochodzi od specyficznego ugrupowania atomów należących do trzech kolejnych aminokwasów - seryny, tyrozyny i glicyny. Ugrupowanie to w czasie około dwóch godzin po syntezie białka tworzy specyficzny chromofor - *p*-hydroksybenzylidenoimidazolinon. Natywna struktura białka nazywana czasem charakteryzuje się dużym stopniem upakowania. Ugrupowanie chromoforu jest ściśle chronione wewnątrz białka, tym samym w bezpośrednim otoczeniu chromoforu znajduje się wiele reszt aminokwasowych, które w pierwszorzędowej strukturze białka są od siebie znacznie oddalone. Owa proksymalna obecność aminokwasów ma diametralny wpływ na procesy absorpcji i emisji kwantów światła. Widmo absorpcji posiada dwa charakterystyczne pasma. Maksimum pierwszego pasma o molowym współczynniku absorpcji ok. 30 000 przypada na długość fali 397 nm. Drugie pasmo posiada maksimum przy długości fali 475nm o molowym współczynniku absorpcji równym ok. 7 000. Widmo emisji ma jedno maksimum dla długości fali ok. 508 nm. Wydajność kwantowa fluorescencji GFP to 0,79.



Widmo wzbudzenia (linia ciągła) i emisji (linia przerywana) GFP wyizolowanego z *A. victoria*

FLUORESCENCJA GRUP PROSTETYCZNYCH.

Fluorescencja białek może pochodzić nie tylko ze wspomnianych łańcuchów bocznych aminokwasów ale również grup prostetycznych połączonych z łańcuchem peptydowym. Typowe grupy prostetyczne, jakimi są porfiryny, wykazują silną emisję światła w długofalowym zakresie światła widzialnego. Energia oraz wydajność kwantowa tej emisji jest silnie uzależniona od rodzaju jonu centralnego, w mniejszym stopniu od obecności dodatkowego liganda aksjalnego. Większość jonów metali otwartopowłokowych wygasza fluorescencję tetrapirołu.



Widmo absorpcji i fluorescencji porfiryny. Znaczny odstęp energetyczny między głównymi pasmami absorpcji i emisji wynika z faktu, że pasmo Soreta jest efektem przejścia ze stanu podstawowego (S_1) na drugi poziom wzbudzony (S_2).

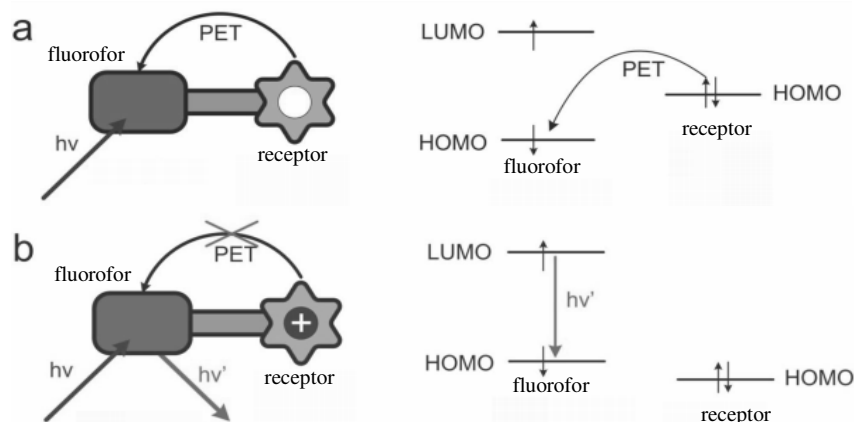
BADANIE WIĄZANIA JONU METALU PRZEZ PORFIRYNY Z WYKORZYSTANIEM POMIARÓW EMISJI.

W naturalnych układach biologicznych inercja jonu metalu prowadząca do utworzenia metaloporfiryny następuje na etapie, w którym pierścień tetrapirolowy jest już w pełni ukształtowany. Wiązanie jonu centralnego jest znacznie utrudnione, głównie ze względu na szczególną sztywność pierścienia makrocyclicznego oddziaływującego z biopolimerami. Tworzenie kompleksu wymaga więc uczestnictwa wyspecjalizowanych enzymów – chelataz. Przypuszcza się, że ich aktywność związana jest ze zdolnością przejściowej deformacji makrocycła.

Dla szeregu jonów metali obserwuje się samorzutne tworzenie kompleksów z ligandami tetrapirołowymi w roztworach. Śledzenie tych reakcji jest łatwe dzięki możliwości wykorzystania prostych technik spektroskopii UV-vis. Obok wyraźnych zmian absorpcji wyrażających się m.in. w przesunięciu pasma Soreta i pasm Q obserwuje się wyraźne zmiany właściwości emisyjnych porfiryny. Wiązanie metalu powoduje przesunięcie pasma a w wielu przypadkach całkowite wygaszenie fluorescencji.

SENSORY OPTYCZNE.

Jednym ze sposobów wykorzystania fotoluminescencji w układach biologicznych jest stosowanie sensorów fluorescencyjnych. Sensory takie są coraz częściej wykorzystywane do analizy podstawowych składników komórkowych. Szczególne miejsce znajdują one m.in. w obrazowaniu zmian stężeń jonów metali zaangażowanych w procesy indukcji sygnałów.



Mechanizm PET na przykładzie wzbudzenia emisji przy związaniu jonu metalu.

Sensory to związki charakteryzujące się szczególną budową, w którą wyróżnić można układ receptorowy i sygnałowy. Dzięki obecności receptora sensory obdarzone są zdolnością tworzenia wiązań koordynacyjnych z wybranym jonem lub cząsteczką. Funkcję układu sygnałowego pełni fluorofor. W wyniku wiązania analitu przez receptor dochodzi do zakłócenia stanów energetycznych sensora, co pociąga za sobą powstanie nowych szczególnych właściwości cząsteczki. Umożliwienie lub zablokowanie możliwości przeniesienia elektronu między receptorem a fluoroforem może powodować wzrost lub spadek intensywności fluorescencji bądź też przesunięcie położenia pasm emisyjnych. Zasada działania sensorów fluorescencyjnych opisywana jest mechanizmem PET (ang. Photoinduced Electron Transfer).

O znaczeniu fluorymetrycznych metod analizy decyduje przede wszystkim prostota oraz wysoka czułość. W porównaniu ze absorpcją światła fluorescencja jest zjawiskiem znacznie bardziej specyficznym dla danego układu. Wynika to z większej powszechności procesów absorpcji fotonów nad procesami ich emisji. Ponadto, w przeciwieństwie do typowych pomiarów spektrofotometrycznych, pozwalających na oznaczanie umiarkowanie wysokich stężeń chromoforów, pomiary fluorescencji nie są szczególnie ograniczane intensywnością luminescencji.

Użyteczność danego sensora w badaniach dotyczących określonego środowiska uzależniona jest od dopasowania powinowactwa receptora do lokalnych stężeń analitu. Zmiany widmowe obserwowane są w charakterystycznym dla danego sensora zakresie stężeń analitu, ograniczonym wielkością stałej trwałości (bądź jej odwrotnością – stałą dysocjacji, K_d). Przyjęto się używać wielkości stałej dysocjacji jako miary wielkości powinowactwa sensora do wybranego analitu.

$$K_d = \frac{[M][S]}{[MS]} \quad M + S \Leftrightarrow MS$$

$$[M] = K_d \frac{[MS]}{[S]}$$

gdzie: M – jon metalu
S – sensor

Jeżeli w wyniku koordynacji badanego jonu (M) zmienia się jedynie wydajność kwantowa fluorescencji sensora (S, wzrost lub spadek intensywności proporcjonalny do zmiany całkowitej intensywności fluorescencji tj. pola powierzchni pod krzywą), wówczas zmiana intensywności tej fluorescencji odczytana np. w maksimum będzie proporcjonalna do zmiany stężenia kompleksu (MS).

Rozważmy przypadek, w którym tworzony kompleks charakteryzuje się wyższą wydajnością kwantową fluorescencji niż wolny sensor. Intensywność fluorescencji (I) rośnie wówczas od wielkości odpowiadającej wolnemu sensorowi (I_{\min}) aż do wysycającego stężenia M (I_{\max}).

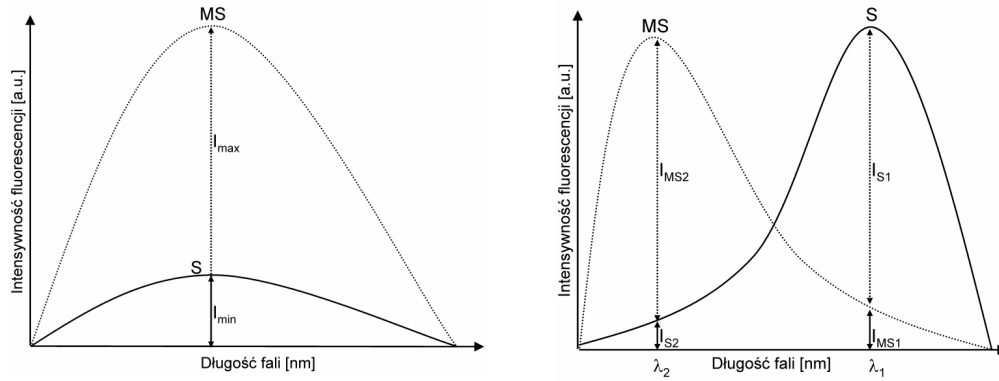
$$I - I_{\min} = [MS]$$

Różnica między zmierzoną wartością I a spodziewaną intensywnością fluorescencji przy wysycającym stężeniu M (I_{\max}) będzie wówczas proporcjonalna do stężenia wolnego sensora:

$$I_{\max} - I = [S]$$

Zatem:

$$[M] = K_d \frac{I - I_{\min}}{I_{\max} - I}$$



W wyniku oddziaływania sensora z jonem metalu możemy obserwować również zmiany widmowe innego rodzaju. Często zdarza się bowiem że energia wzbudzenia lub emisji powstającego kompleksu jest inna niż wolnego sensora. Możemy wówczas wykorzystać zmiany intensywności sygnału wynikające zarówno z zaniku pasma wolnego indykatora (I_1) jak i tworzenia nowego pasma charakterystycznego dla kompleksu z oznaczanym jonem (I_2). Mierząc intensywność fluorescencji przy charakterystycznych długościach fali (λ_1 – dla zanikającego pasma wolnego S, λ_2 – dla narastającego pasma kompleksu MS) oznaczmy:

- I_{S1} – intensywność fluorescencji sensora w λ_1
- I_{MS1} – intensywność fluorescencji kompleksu w λ_1
- I_{S2} – intensywność fluorescencji sensora w λ_2
- I_{MS2} – intensywność fluorescencji kompleksu w λ_2

Zachodzą wówczas zależności:

$$I_1 = I_{S1}[S] + I_{MS1}[MS] \quad \text{oraz} \quad I_2 = I_{S2}[S] + I_{MS2}[MS]$$

a także:

$$I_{\max 1} = I_{S1}[S] \quad \text{oraz} \quad I_{\max 2} = I_{MS2}[MS]_{\max}$$

Stosunek intensywności fluorescencji przy wybranych długościach fali (R) jest równy:

$$R = \frac{I_1}{I_2} = \frac{I_{S1}[S] + I_{MS1}[MS]}{I_{S2}[S] + I_{MS2}[MS]}$$

Ponieważ:

$$[MS] = \frac{[M][S]}{K_d}$$

zatem:

$$R = \frac{I_{S1} + I_{MS1} \frac{[M]}{K_d}}{I_{S2} + I_{MS2} \frac{[M]}{K_d}}$$

$$\frac{[M]}{K_d} = \frac{RI_{S2} - I_{S1}}{I_{MS1} - RI_{MS2}}$$

$$\frac{[M]}{K_d} = \frac{R - \frac{I_{S1}}{I_{S2}}}{\frac{I_{MS1}}{I_{MS2}} - R} \left(\frac{I_{S2}}{I_{MS2}} \right)$$

Występujące w powyższym równaniu wyrażenia I_{S1}/I_{S2} oraz I_{MS1}/I_{MS2} są granicznymi wartościami R odnoszącymi się odpowiednio do wolnego sensora (R_{\min}) i maksymalnego stężenia kompleksu MS (R_{\max}). Oznaczając $I_{S2}/I_{MS2} = R'$ otrzymujemy ostatecznie:

$$[M] = K_d \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} R'$$

Na wykresie logarytmu ze stężenia wolnych jonów metalu od $\log((I - I_{min})/(I_{max} - I))$ lub $\log((R - R_{min})/(R_{max} - R))$ w pewnym zakresie zależność ta ma przebieg liniowy. Zakres ten odpowiada zakresowi czułości sensora na oznaczany jon metalu. Wyraz wolny w równaniu prostej daje odpowiednio logarytm K_d oraz sumę logarytmów K_d i R' .

OZNACZANIE STĘŻENIA JONÓW WAPNIA W KOMÓRKACH.

Wapń jest pierwiastkiem chemicznym o niebagatelnej roli biologicznej. Pod względem ilościowej zawartości w komórkach zalicza się go do makroelementów. Tworzy liczne kompleksy z biopolimerami i mniejszymi endogennymi ligandami, nierozpuszczalne sole (głównie fosforany), występuje również w postaci wolnych jonów Ca^{2+} . Ta ostatnia frakcja, choć stosunkowo nieliczna, posiada szczególne znaczenie dla prawidłowego przebiegu istotnych procesów biochemicznych. Jony Ca^{2+} , ze względu na swoje właściwości koordynacyjne pełnią funkcję przekaźników II rzędu w łańcuchach przekazu sygnałów. Pomimo niskich stężeń wolnych jonów wapnia w cytoplazmie, to właśnie ten przedział komórki jest bezpośrednim ich dostarczycielem i odbiorcą. Fakt ten sprawił, że w ostatnich latach daje się zaobserwować wzrost zainteresowania i nasilenie badań dotyczących cytoplazmatycznej gospodarki wapniowej w komórkach eukariotycznych. Jednym z podstawowych przejawów funkcjonowania systemu odpowiedzialnego za tą gospodarkę jest gwałtowna zmiana cytoplazmatycznego stężenia wolnych jonów Ca^{2+} . Zakresy tych stężeń kształtują się następująco:

- Całkowite cytoplazmatyczne stężenie wapnia: 0,1 - 10 mM
- Stężenie wolnych jonów Ca^{2+} w komórkach spoczynkowych: 50 - 200 nM
- Stężenie wolnych jonów Ca^{2+} w stanie pobudzenia komórki: 0,1 - 1 μ M
- Stężenie wolnych jonów Ca^{2+} w stanie pobudzenia neuronów i komórek mięśniowych: lokalnie do 100 μ M
- Zewnątrzkomórkowe stężenie wolnych jonów Ca^{2+} : ~1 mM

Tak duże zmiany $[Ca^{2+}]$ związane z pobudzeniem komórki wiążą się z rolą stymulatora licznych procesów biochemicznych. Rola ta wymaga możliwości szybkiego uwalniania Ca^{2+} na zewnątrz komórki oraz jego ponownego gromadzenia w jej wnętrzu.

Oscylacje cytoplazmatycznego poziomu wapnia zachodzą gwałtownie w ciągu kilku do kilkunastu sekund po zadziałaniu bodźca. Po tym okresie obserwuje się zazwyczaj równie szybki spadek cytoplazmatycznego $[Ca^{2+}]$ do poziomu rejestrowanego w stanie spoczynku. W stanach stresowych tempo spadku tego stężenia jest znacznie niższe. Oprócz struktur błonowych odpowiedzialnych za transport jonów wapnia, w procesie prowadzącym do powstawania oscylacji cytoplazmatycznego $[Ca^{2+}]$ udział biorą m.in. białko wiążące GTP, fosfolipaza C oraz wewnątrzkomórkowe wtórne przekaźniki sygnałów, w tym IP3 i DG.

Do najważniejszych procesów związanych z aktywnością Ca^{2+} zaliczyć należy proces widzenia, kaskadę fosfoinozitolową i regulację skurczu mięśni. Kation wapniowy pełni tu rolę wewnątrzkomórkowego „informatora” w szlakach przekazywania sygnałów. W procesach tych białka regulatorowe i enzymatyczne oddziałują z receptorami, natomiast kolejne ogniwa sprzęgane są przez działanie małowcząsteczkowych lub jonowych przekaźników. Jon Ca^{2+} , uwalniany bezpośrednio do wnętrza komórki po zadziałaniu bodźca, zalicza się do grupy przekaźników wtórnych lub II rzędu.

O użyteczności Ca^{2+} jako przekaźnika decydują:

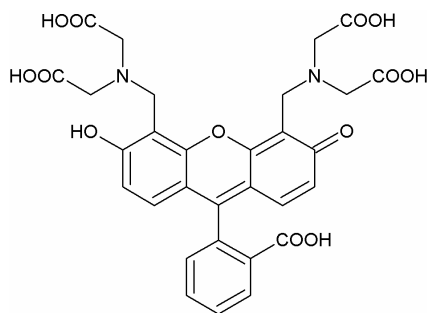
- Zdolność tworzenia kompleksów z białkami. Wysokie liczby koordynacji umożliwiają przy tym równoczesne wiązanie z wieloma ligandami, co prowadzi do sieciowania różnych segmentów białka i indukowania dużych zmian konformacyjnych.
- Wysokie powinowactwo do grup tlenodonorowych. Cecha ta odróżnia jony wapnia od potencjalnie konkurencyjnych kationów Mg^{2+} .
- Rozbudowany system przenoszenia Ca^{2+} przez błony. Sprawnie działające pompy wapniowe i wymiennicze sodowo-wapniowe zapewniają szybki i selektywny transport tego kationu na zewnątrz i do wnętrza komórki.

Wśród białek wiążących wapń najbardziej rozpowszechniona w komórkach eukariotycznych jest kalmodulina. Aktywacja kalmoduliny jest wynikiem wiązania trzech lub czterech jonów Ca^{2+} , zachodzącego przy dużym wzroście stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie. Powstały w ten sposób kompleks aktywuje liczne enzymy, pompy jonowe i inne białka docelowe. Do tych ostatnich należy m.in. kinaza CaM II, odpowiedzialna za fosforylację innych białek oraz syntaza NO decydująca o uwalnianiu tlenu azotu w reakcji rozkładu argininy.

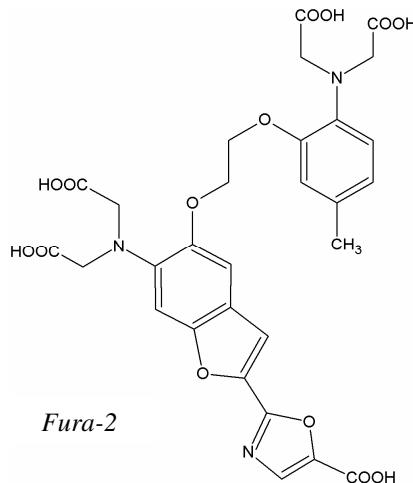
Obok wapnia w układach biologicznych występują również inne metale drugiej grupy układu okresowego. Jony tych metali oddziałują w komórkach z mało- lub wielkowcząsteczkowymi ligandami. Trwałość kompleksów z określonym typem liganda zależy m.in. od ładunku i promienia jonu centralnego. Przy

zachowaniu tego samego ładunku (dla drugiej grupy układu okresowego – M^{2+}) większy promień nie uwodnionego jonu zapewnia wyższą liczbę koordynacyjną. Dla stosunkowo dużych jonów Ca^{2+} liczba ta mieści się w zakresie 6 - 12, przy czym najczęściej spotyka się ośmiokoordynacyjne kompleksy wapniowe. Podobnie wysokie liczby koordynacyjne charakteryzują kompleksy strontu i baru. Znacznie mniejszy promień jonu Mg^{2+} sprawia, że kompleksy magnezowe nie wykazują liczby koordynacyjnej wyższej od 6. Z tej też przyczyny Ca^{2+} znacznie silniej oddziałuje z dużymi wielokleszczowymi ligandami niż Mg^{2+} . O właściwościach ligandów decydują w dużej mierze właściwości atomów donorowych. W układach biologicznych najczęściej spotyka się kompleksy wapnia z donorowym atomem tlenu. Dla porównywalnych stężeń Ca^{2+} i Mg^{2+} duże chelatowe tlenodonory zazwyczaj specyficznie wiążą się z wapniem. Konkurencja o to wiązanie pojawia się dopiero przy znacznym nadmiarze Mg^{2+} . Ze względu na znikomą zawartość jonów Sr^{2+} i Ba^{2+} w komórkach można pominąć ich udział w konkurencji o wiązanie wspomnianych ligandów. Tlenodonorowe grupy funkcyjne ligandów mogą być zarówno zjonizowane (anionowe grupy karboksylowe, fosforanowe, fenolowe) jak i elektrycznie obojętne (grupy eterowe, karbonylowe, hydroksylowe). Ze względu na ujemny ładunek tych pierwszych, wiążą one silniej Ca^{2+} niż ligandy elektrycznie obojętne.

Użyteczność danego sensora Ca^{2+} w badaniach dotyczących określonej tkanki i jej stanu fizjologicznego uzależniona jest od szeregu czynników. Do najważniejszych zaliczyć należy selektywność jonową oraz wrażliwość na pH i obecność endogennych składników komórki. Jednym z pierwszych fluorescencyjnych sensorów wapnia była pochodna fluoresceiny - kalceina. Maksimum absorpcji tego związku przypada na 495 nm natomiast maksimum fluorescencji na 515 nm. Kalceina ma właściwości samowygaszające powyżej stężenia 100 mM. Ponadto intensywność fluorescencji kalceiny oraz jej selektywność w stosunku do jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} zależą bardzo wyraźnie od pH roztworu. Z tego powodu kalibracja powinna być prowadzona w warunkach ściśle odpowiadających badanemu środowisku. Zmiany widmowe wywołane koordynacją jonu metalu obserwowane są w charakterystycznym dla danego sensora zakresie stężeń Ca^{2+} . Zakres ten określa stosowność sensora w układach biologicznych (różnych typach komórek, oraz przy odmiennych stanach fizjologicznych - relaksacji, pobudzenia, stanach patologicznych). Większość indykatorów pierwszej generacji umożliwiało prowadzenie badań w zakresie fizjologicznego cytoplazmatycznego stężenia Ca^{2+} komórek w stanie spoczynkowym. Istnieją jednak obszary, których pobudzenie pociąga za sobą gwałtowny wzrost $[Ca^{2+}]$ do poziomu wykraczającego poza górną granicę oznaczalności klasycznych sensorów wapniowych. Badanie tych szczególnych stanów komórki stało się możliwe po wprowadzeniu w roku 1998 nowej generacji fluorescencyjnych sensorów wapniowych, takich jak Fura-2.

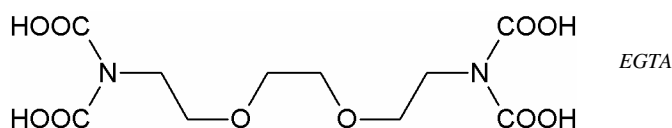


Kalceina



Fura-2

W porównaniu z wcześniej używanymi, nowe sensory wykazują niższe powinowactwo do Ca^{2+} zachowując wysoką selektywność jonową. Wspólnym elementem strukturalnym tych związków jest ugrupowanie receptorowe oparte na bazie kwasu etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N' tetraoctowego – chelatora jonów wapniowych, stosowanego powszechnie m.in. w procedurach kalibracyjnych sensorów fluorescencyjnych.



EGTA

PRZEBIEG ĆWICZENIA

1. Pomiar widm emisji i wzbudzenia tryptofanu oraz albuminy wołowej.
2. Wygaszanie fluorescencji białka jonami jodkowymi.
3. Pomiar widm emisji i wzbudzenia związków tetrapirolowych. Porównanie emisji chlorofilu i chlorofiliny.
4. Badanie reakcji feofityny *a* z jonami Zn^{2+} i/lub Cu^{2+} . Wyznaczenie obserwowanej stałej szybkości z pomiaru fluorescencji w warunkach eksperymentalnych.
5. Pomiar widm wzbudzenia Fura-2 w obecności różnych stężeń jonów Ca^{2+} . Wyznaczenie zakresu czułości sensora na jony wapniowe oraz stałej dysocjacji kompleksu sensora z jonem metalu.

LITERATURA

1. S. Paszyc *Podstawy fotochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992,
2. P. Suppan *Chemia i światło*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997
3. J.R. Lakowicz *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer 2006
4. J. Twardowski *Biospektroskopia*, tom 3, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1990
5. A. Kawski *Fotoluminescencja roztworów*, Warszawa, PWN 1992.
6. J. Kęcki *Podstawy spektroskopii molekularnej*, Warszawa, PWN 1998
7. G. Stochel, M. Brindell, W. Macyk, Z. Stasicka, K. Szaciłowski *Bioinorganic photochemistry*, Wiley, 2009.